VERÄNDERUNGEN VON STOFFWECHSELGRÖSSEN BEI DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM IN FRÜHEN PHASEN DER DIFFERENZIERUNG

von

Arnhold Baller

1976

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
der Ruhr-Universität Bochum

VERÄNDERUNGEN VON STOFFWECHSELGRÖSSEN BEI DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM IN FRÜHEN PHASEN DER DIFFERENZIERUNG

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Arnhold Baller
aus
Kowanz/Pommern

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1976

Referent: Prof. Dr. med. August Wilhelm Holldorf

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bertold Hock

Abkürzungen:

Standard-Abkürzungen werden ohne weitere Erläuterungen nach den IUPAC-IUB-Regeln (siehe Biochimica et Biophysica Acta, Information for Contributors, (1971)) oder DIN-Vorschriften (siehe WINTER, Die neuen Einheiten im Meßwesen, Verlag W. Girardet, Essen (1973)) gebraucht.

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

1.	EINLEITUNG	Seite 1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	M a t e r i a l	9
2.1.1.	Verwendete Organismen	9
2.1.1.1.	Dictyostelium discoideum	9
2.1.1.2.	Escherichia coli	9
2.1.2.	Nährböden und Medien	9
2.1.2.1.	Für D. discoideum	9
2.1.2.1.1.	Maismehl-Agar zur Keimung der Sporen	9
2.1.2.1.2.	Phosphat-Agar zur Differenzierung und für Dauerkulturen	10
2.1.2.1.3.	Medium zur Vermehrung von Amöben in Submerskultur	10
2.1.2.1.4.	"Hungermedium"	10
2.1.2.2.	Für E. coli B/2	11
2.1.2.2.1.	Pepton-Glucose-Agar für Dauerkulturen	11
2.1.2.2.2.	Flüssigmedium zur Vermehrung der Bakterien	11
2.2.	M e t h o d e n	11
2.2.1.	Gewinnung der zur Untersuchung benötigten Organismen	11
2.2.1.1.	Anzucht, Ernte und Lagerung der als Nahrung verwendeten Bakterien	11
2.2.1.2.	Herstellung von E. coli - Dauerkulturen	12
2.2.1.3.	Keimung, Vermehrung und Ernte der Amöben	13
2.2.1.4.	Inkubation der Amöben im Hungermedium	14
2.2.1.5.	Differenzierung der Amöben auf nährstoffreien Agarplatten	14
2.2.1.6.	Herstellung von D. discoideum-Dauerkulturen	14

2.2.2.	Analytische Methoden	15
2.2.2.1.	Bestimmung der Zellzahl	15
2.2.2.2.	Bestimmung des Trockengewichtes	16
2.2.2.3.	Messung der Atmungsaktivität	16
2.2.2.4.	Messung des pH-Wertes im Außenmedium	16
2.2.2.5.	Messung der UV-Absorption im Außenmedium	16
2.2.2.6.	Proteinbestimmung	17
2.2.2.7.	Bestimmung der löslichen Kohlenhydrate (Glykogen)	17
2.2.2.8.	RNA-Bestimmung	19
2.2.3.	Extraktionsgänge	20
2.2.3.1.	Fraktionierung der Zellbestandteile	20
2.2.3.2.	Extraktion und Reinigung der RNA	24
2.2.4.	Dichtegradientenzentrifugation	29
2.2.5.	Auftrennung der RNA an Poly(U)-Sepharose	32
2.2.6.	Arbeiten mit radioaktiv markierten Substanzen	33
2.2.6.1.	Einbau radioaktiv markierter Substanzen	33
2.2.6.2.	Behandlung der radioaktiv markierten Zellen	33
2.2.6.3.	Verwendung von silanisierten Glasfaserfiltern	34
2.2.6.4.	Messung der Radioaktivität	35
2.2.7.	Photographische Methoden	36
2.3.	Herkunft der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Nährböden	37

3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	Vermehrung von D. discoideum	38
3.2.	Konstanz der Zellzahl im flüssigen Hungermedium	39
3.3.	Ablauf der morphologisch sichtbaren Differenzierung von D. discoideum nach verschiedenen Zeiten der Inkubation im Hungermedium	41
3.4.	Physikalisch meßbare Veränderungen in den Zellen und im Medium	45
3.5.	Veränderungen im Trockengewicht, im Protein- und RNA-Gehalt sowie im Anteil der löslichen Kohlenhydrate (Glykogen)	47
3.6.	Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen	52
3.6.1.	Proteinstoffwechsel	52
3.6.1.1.	Voraussetzungen für die selektive Markierung von Zellinhaltsstoffen in D. discoideum mit (1-^{14}C)-Leucin	52
3.6.1.2.	Einbau von (1-^{14}C)-Leucin in D. discoideum während der Vermehrungsphase und während der Inkubation der Amöben im Hungermedium	56
3.6.1.3.	Der Weg der aus (1-^{14}C)-Leucin stammenden Radioaktivität in den verschiedenen Zellinhaltsstoffen während des Hungers	59
3.6.2.	RNA-Stoffwechsel	62
3.6.2.1.	Voraussetzungen für die selektive radioaktive Markierung von Zellinhaltsstoffen in D. discoideum mit (5,6-^{3}H)-Uracil und (2-^{14}C)-Uracil	62
3.6.2.2.	Einbau von (2-^{14}C)-Uracil in D. discoideum während der Vermehrungsphase der Amöben und im Hungermedium	66

3.6.2.3. Untersuchungen des Einbaus von ($5,6-^3H$)-Uracil durch Bestimmung der radioaktiven Markierung in extrahierter und gereinigter RNA 69

3.6.2.4. Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat in D. discoideum während des Hungers 75
a) Abhängigkeit vom Orthophosphatgehalt des Mediums 75
b) Markierung zu verschiedenen Zeiten des Hungers 77

3.6.2.5. Untersuchungen des mit (^{32}P)-Orthophosphat markierten Zellmaterials 80
a) Dichtegradientenzentrifugation 80
b) Bindung an Poly(U)-Sepharose 84

3.6.2.6. Abbau radioaktiv markierter RNA während der Inkubation im Hungermedium und während der Differenzierung der Zellen auf Phosphat-Agar-Platten 85

4. DISKUSSION 89

5. ZUSAMMENFASSUNG 102

6. LITERATURVERZEICHNIS 104

1. EINLEITUNG

Mit *Dictyostelium discoideum* wurde im Jahre 1935 von RAPER eine "neue Schleimpilzart von verwesendem Laub" isoliert (1). Diese Art zählt zu den zellulären Schleimpilzen (Acrasiales). Eine phylogenetische Beziehung zwischen den zellulären und den echten Schleimpilzen (Myxomycetales) wird von BONNER ausdrücklich verneint (2). Zelluläre Schleimpilze bilden im Gegensatz zu den echten Schleimpilzen kein plasmodiales Syncytium, sondern ein Pseudoplasmodium, in dem jede von einer Zellwand umschlossene Zelle ihren eigenen Kern hat. Acrasiales wie Myxomycetales bilden in ihren Entwicklungszyklen Sporen. Die Sporen der Acrasiales keimen zu Amöben aus, die Sporen der Myxomycetales zu Flagellaten.

Für alle Schleimpilze gilt, daß sie primitive soziale Lebewesen sind, die sowohl pilz- als auch tierähnlichen Charakter haben (2).

Der morphologisch leicht überschaubare Entwicklungszyklus von *D. discoideum* ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Er besteht aus drei Teilen:

I. Keimung der Sporen
II. Wachstum und Vermehrung der Amöben mit Phagozytose von Bakterien
III. Differenzierungszyklus

Die meisten Stämme von *D. discoideum* benötigen als Nahrungsquelle lebende Bakterien (z.B. *Escherichia coli* oder *Aerobacter aerogenes*). Andere - als "axenisch" bezeichnete

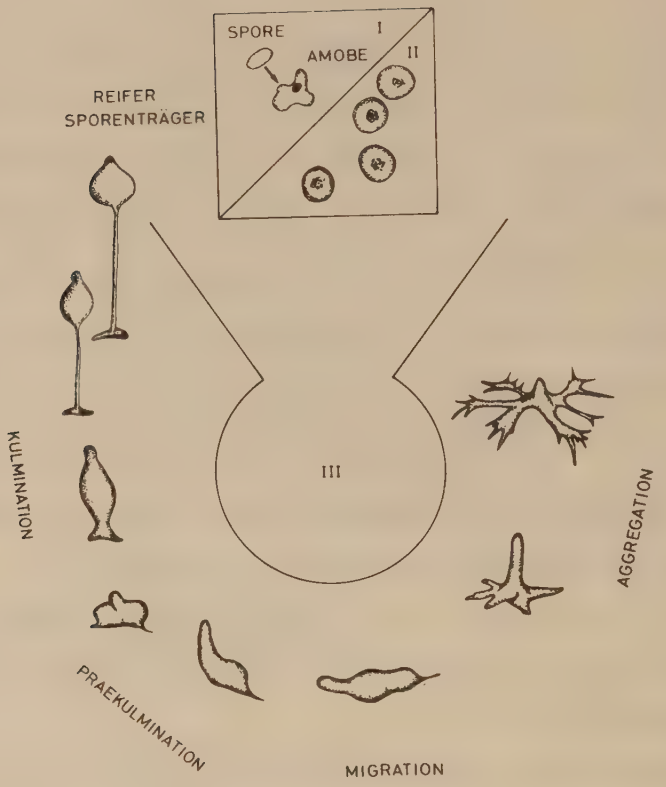


Abb. 1: Entwicklungszyklus von D. d i s c o i d e u m

I. Sporenkeimung auf Agarplatten
II. Wachstum und Vermehrung der Amöben in Submerskultur
III. Differenzierungszyklus verändert nach WARD (4)

Größenverhältnisse:
Amöbendurchmesser: 11 µm (5)
Sporenlänge: 6 - 9 µm
Sporenbreite: 2,5 - 3,5 µm (1)
Höhe des reifen Sporenträgers: 1,5 - 3 mm (1)

Stämme sind nicht auf lebende Bakterien als Nahrungsquelle angewiesen, sondern können auf synthetischem Medium wachsen (3). Das Wachstum dieser Stämme ist gegenüber dem der oben genannten jedoch sehr verlangsamt. Die Generationszeit beträgt etwa 10 Stunden.

Ist die Nahrung verbraucht, oder wird sie im Experiment abgetrennt, so läuft der Differenzierungszyklus in etwa 24 Stunden ab. Für den vollständigen Ablauf des Differenzierungszyklus ist das Vorhandensein eines festen, nährstoffreien Mediums Voraussetzung. Man kann den Differenzierungszyklus in vier Phasen einteilen (6). Nacheinander laufen die Aggregations-, die Migrations-, die Praekulminations- und die Kulminationsphase ab (s. Abb. 1).

In der Aggregationsphase gehen von bestimmten Amöben, die zu Aggregationszentren werden, Signale aus, die mit den Amöben eines bestimmten Areals interferieren. Dabei bilden sich typische Aggregationsmuster aus (7). Der chemotaktisch wirksame Stoff, zunächst von BONNER als Acrasin bezeichnet (8), ist inzwischen als 3',5'-cyclo-AMP identifiziert worden (9, 10, 11).

Nach etwa zwölf Stunden sind Aggregate entstanden, die sogenannten Pseudoplasmodien. Jedes dieser Aggregate enthält etwa 10^5 Zellen (12).

Abhängig von Umweltbedingungen können die Pseudoplasmodien für verschieden lange Zeit in die Migrationsphase eintreten. Während dieser Zeit erfolgt im wesentlichen die

Präformierung der späteren Sporen- und Stielzellen (13, 14). Es gibt aber auch Anzeichen dafür, daß sogar schon vor der Aggregationsphase eine gewisse Präformierung stattfindet (15). Nach Beendigung der Migrationsphase richtet sich das Pseudoplasmodium in der Praekulminationsphase auf.

In der darauffolgenden Kulminationsphase wandern die zu Sporen prädestinierten Zellen an den Stielzellen aufwärts. Hier bildet sich das Sporenköpfchen. Es ist schwach gelblich und zitronenförmig. Der Durchmesser beträgt 125 - 300 µm. Der Stiel, an dessen oberen Ende das Köpfchen sitzt, ist 1,5 - 3 mm hoch und durch Fußzellen am Untergrund angeheftet (1).

Die Differenzierung hat also zwei ganz unterschiedliche Zelltypen hervorgebracht: Sporen- und Stielzellen. Nach BONNER et al. werden etwa 85 % der Amöben während der Differenzierung zu Sporen und etwa 15 % zu Stielzellen (16).

So eindeutig die morphologische Differenzierung abläuft, so schwierig ist es, die Differenzierungsvorgänge biochemisch und molekularbiologisch zu analysieren. Doch wurden gerade auf diesen Gebieten in letzter Zeit erhebliche Fortschritte gemacht.

Zu den wesentlichen Ergebnissen gehört, daß während des Ablaufs des Differenzierungszyklus auf fester Oberfläche die Neusynthese verschiedener Enzyme stattfindet. Dabei handelt es sich um eine Neusynthese, die wahrscheinlich auf der Stufe der Transcription kontrolliert wird. Die

Bildung dieser Enzyme wird durch Hemmstoffe der Transcription (z.B. Actinomycin D) unterdrückt. Besonders gut wurden unter diesen Gesichtspunkten alkalische Phosphatase (17), Tyrosintransaminase (18), Aminopeptidase (19), Acetylglucoaminidase (20) und vor allem die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (21) untersucht. Das im Zeitablauf gesteuerte Erscheinen dieser Enzyme ist sicher für den Ablauf der Diffenrenzierung von großer Bedeutung. Ob hiermit jedoch der Schlüssel zum Verständnis der Differenzierung gefunden ist, kann bisher nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Ebenso wichtig sind deshalb Untersuchungen des Stoffwechsels, die Veränderungen des Gehalts verschiedener Zellinhaltsstoffe beschreiben. Von besonderem Interesse sind hier die Makromoleküle, nämlich Kohlenhydrate (22, 23), Proteine (24, 25) und Polynukleotide (26, 27). Die hierüber in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind wiederum durch Versuche an Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren, gewonnen worden.

In der vorliegenden Arbeit werden im wesentlichen Zellen untersucht, die nach Abtrennen der Bakterien in flüssigem Hungermedium gehalten werden (Abb. 2). Das Hungermedium besteht aus einem 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 (siehe 2.1.2.1.4.). Hier unterbleibt die morphologische Differenzierung, die auf fester Oberfläche nach Durchlaufen einer Phase ohne morphologische Veränderung der Zellen mit der Aggregationsphase beginnen würde.

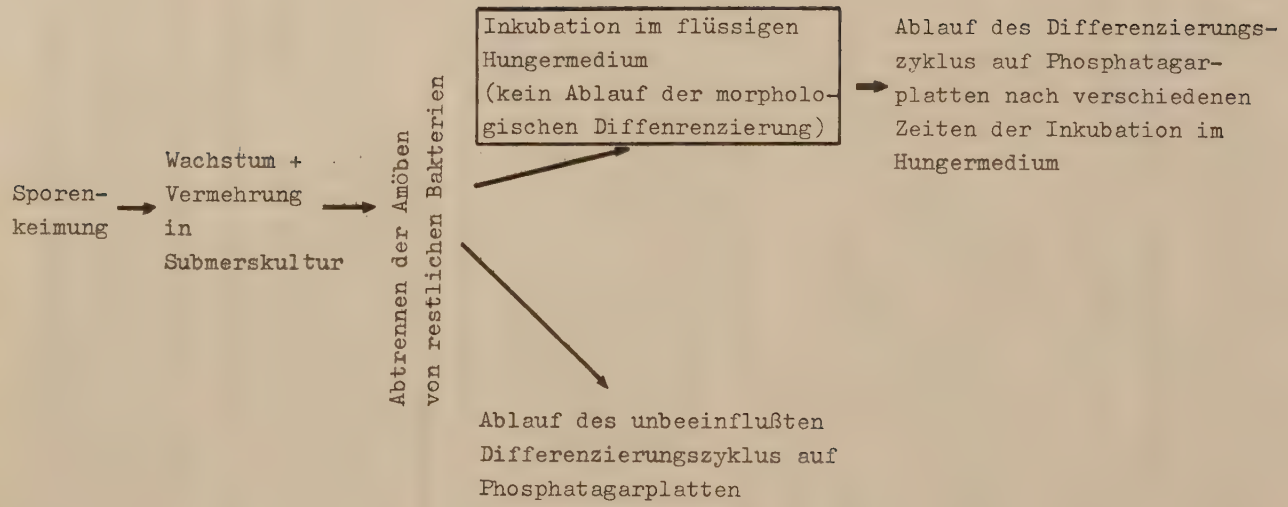


Abb. 2: Einordnung des Zeitraums, in dem die wesentlichen Untersuchungen an D. d i s c o i d e u m in dieser Arbeit durchgeführt werden.

Untersuchungen von GERISCH zeigen, daß während der Inkubation im flüssigen Hungermedium eine fortschreitende Bereitschaft zur Zellkontaktbildung auftritt. Zunächst bilden die Zellen unter diesen Bedingungen lose Agglutinate. Dieser Vorgang kann durch EDTA-Zugabe unterdrückt werden. Später, nach etwa 8 - 10 h, kann das EDTA die Agglutinationsfähigkeit nicht mehr beeinflussen. Nach 8 - 10 h sind die Zellen aggregationsreif geworden, das bedeutet, sie beginnen unmittelbar zu aggregieren, wenn sie auf eine feste Oberfläche übertragen werden (28, 29). Diese Beobachtung macht deutlich, daß die Zellen intensive Veränderungen erfahren müssen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Antwort auf folgende Fragen zu finden:

1. Welchen Einfluß hat eine unterschiedlich lange Dauer der Inkubation im Hungermedium auf den Ablauf einer nachfolgenden Differenzierung? Insbesondere wird auch untersucht, ob und in wieweit ein Teil der späteren Differenzierung auf fester Oberfläche bereits während der Hungerphase in flüssiger Kultur vorweggenommen werden kann.
2. Welche Veränderungen treten in der Zusammensetzung der makromolekularen Zellbestandteile (Glykogen, Proteine und Ribonukleinsäuren) während einer Inkubation im Hungermedium ein? Findet nur ein Abbau dieser Makromoleküle statt, oder läßt sich auch eine Neusynthese nachweisen? Besondere Beachtung soll hier die Neusynthese von Proteinen und Ribonukleinsäuren finden.

3. In welchem Verhältnis stehen die hier beobachteten Veränderungen zu den Vorgängen bei der Differenzierung auf festem Medium ohne vorhergehende Hungerphase in flüssigem Medium?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Organismen

2.1.1.1. Dictyostelium discoideum

Die Untersuchungen werden an *Dictyostelium discoideum* NC-4 (haploid) ATCC 11735 durchgeführt.

2.1.1.2. Escherichia coli

Als Nahrung dienen den Amöben Bakterien des Stammes *Escherichia coli* B/2. Dieser Stamm wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. GERISCH, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Nährböden und Medien

2.1.2.1. Für D. discoideum

2.1.2.1.1. Maismehl-Agar zur Keimung der Sporen

2,0 g Corn-Meal-Extract (OXOID) und 15,0 g Agar (DIFCO) werden in destilliertem Wasser gelöst, bzw. suspendiert, so daß das Endvolumen 1,0 Liter beträgt. Der pH-Wert beträgt 6,0. Die Suspension wird 15 min bei 120°C autoklaviert. Der so bereitete Agar wird unter sterilen Bedingungen in Petrischalen von 9 cm Durchmesser ausgegossen. Jede Petrischale enthält ungefähr 10 ml Agar.

2.1.2.1.2. Phosphat-Agar zur Differenzierung und für Dauerkulturen (30)

1,36 g KH_2PO_4 (Endkonzentration 0,01 M) und 0,372 g EDTA (Na-Salz) (Endkonzentration 0,001 M) werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1 N KOH auf den pH-Wert 6,5 eingestellt. 20,0 g DIFCO-Agar werden zugesetzt und mit destilliertem Wasser auf 1,0 Liter ergänzt. Weiter wird wie unter 2.1.2.1.1. beschrieben verfahren.

2.1.2.1.3. Medium zur Vermehrung von Amöben in Submerskultur (31)

Als Kulturmedium dient ein 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 (siehe 2.1.2.1.4.), in dem als Nahrung Zellen von E. c o l i B/2 in einer Zelldichte von $1x10^{10}$ Zellen/ml suspendiert sind.

2.1.2.1.4. "Hungermedium"

Als Hungermedium dient ein 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 (M/60 Sörensenpuffer), der wie folgt hergestellt wird:

2,27 g KH_2PO_4 werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 5 N NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Anschliessend wird soviel destilliertes Wasser hinzugefügt, daß das Endvolumen 1,0 Liter beträgt.

2.1.2.2. Für E. coli B/2

2.1.2.2.1. Pepton-Glucose-Agar für Dauerkulturen

1,0 g Bacteriological Peptone (OXOID), 1,0 g Glucose und 20,0 g Agar (DIFCO) werden in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 (siehe 2.1.2.1.4.) gelöst bzw. suspendiert, so daß das Gesamtvolumen 1,0 Liter beträgt. Jeweils 200 ml dieser Suspension werden getrennt autoklaviert. Für Temperatur und Zeit gilt das unter 2.1.2.1.1. Gesagte. Der Agar wird in Petrischalen und Kulturröhrchen ausgegossen.

2.1.2.2.2. Flüssigmedium zur Vermehrung der Bakterien

E. c o l i B/2 wird in 2,5 %iger Standard-I-Nährbouillon (MERCK AG, Darmstadt) angezüchtet. 25,0 g des Substanzgemisches werden in destilliertem Wasser gelöst, so daß die Gesamtmenge 1,0 Liter beträgt. Die Lösung wird 15 min bei 120°C autoklaviert. Größere Ansätze werden direkt im Fermenter bei derselben Temperatur, jedoch 30 min autoklaviert. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Mediums ist bei 37°C 7,5 ($\pm$ 0,1).

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung der zur Untersuchung benötigten Organismen

2.2.1.1. Anzucht, Ernte und Lagerung der als Nahrung verwendeten Bakterien

Die Bakterien des Stammes E. c o l i B/2 werden von Dauerkulturröhrchen (2.2.1.2.) auf Standard-I-

Nährbouillon (MERCK) überimpft. Zunächst werden Vorkulturen von 25 ml angezüchtet. Diese werden auf einen vorbereiteten Fermenter übertragen. Zur Verwendung kommt der BIOSTAT (BRAUN MELSUNGEN). Er wird mit 8,0 l Standard-I-Nährbouillon beschickt und mit allem nötigen Zubehör autoklaviert. Anschließend wird die Temperatur auf 37°C einreguliert und die Vorkultur unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Der Fermenterinhalt wird mit 250 Upm umgewälzt. Die Luftzufuhr wird auf 5 l/min eingestellt. Die Luft wird durch Vorschalten eines Luftfilters keimfrei gemacht, auf 37°C angewärmt und befeuchtet.

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase werden die Zellen 20 min bei einer maximalen Beschleunigung von 27.000 x g abzentrifugiert. Anschließend werden sie dreimal in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen. 8,0 l Medium ergeben etwa 62 g feuchte Zellen von E. c o l i B/2. Die Coli-Bakterien werden sogleich unter sterilen Bedingungen in Portionen von etwa 4 g Feuchtgewicht in sterile Glasgefäße gefüllt. In diesen Glasgefäßen werden sie bis zum Verbrauch bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.2. Herstellung von E. coli - Dauerkulturen

Dauerkulturen von E. c o l i B/2 werden in Schrägagarröhrchen mit Pepton-Glucose-Agar (2.1.2.2.1.) bei 4°C aufbewahrt. Etwa alle vier Wochen werden die Zellen

auf neue Dauerkulturröhrchen überimpft und etwa 24 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3. Keimung, Vermehrung und Ernte der Amöben

Auf Maismehl-Agar-Platten (siehe 2.1.2.1.1.) werden zunächst je Platte 5 Tropfen einer Suspension von $1x10^{10}$ E. c o l i B/2-Zellen/ml 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 mit Hilfe eines Drigalski-Spatels gleichmäßig verteilt. Anschließend wird jede Platte mit ungefähr $1x10^{7}$ Sporen von D. d i s c o i d e u m beimpft. Die Platten werden 24 h bei 20 - 23°C inkubiert.

Die auf zwei Maismehl-Agar-Platten gekeimten Amöben werden mit 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 von der Agaroberfläche gewaschen und in 200 ml einer Suspension von E. c o l i B/2 ($1x10^{10}$ Zellen/ml) in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 übertragen. Geschüttelt werden die Kulturen in 750 ml-Klettkolben im Wasserbad bei 22 - 23°C. Die Schüttelfrequenz des Reziprokschüttlers beträgt 88 Upm. Nach etwa 36 h wird unter diesen Bedingungen die stationäre Vermehrungsphase der Amöben erreicht.

Die Amöben werden 3 min bei maximal 650 x g in der WKF-Kühlzentrifuge, Typ G50K, abzentrifugiert. Die Zellen werden dreimal in der gleichen Menge 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen.

2.2.1.4. Inkubation der Amöben im Hungermedium

Sofort nach dem Waschen werden die Amöben in das Hungermedium (siehe 2.1.2.1.4.) überführt. Die Amöbenkonzentration beträgt, wenn im Einzelfall nichts anderes angegeben ist, 0,5 - $1x10^7$ Zellen/ml. Die Zellen werden wiederum bei 22 - 23°C im Wasserbad bei 88 Upm inkubiert. Die Dauer dieser Inkubationszeit wird im folgenden als "Hungerzeit" bezeichnet. Sie liegt in den hier durchgeführten Experimenten zwischen 0 - 42 h. Zur Ausschaltung bakterieller Kontamination wird Streptomycinsulfat in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt.

2.2.1.5. Differenzierung der Amöben auf nährstoffreien Agarplatten

Zunächst werden Phosphat-Agar-Platten (siehe 2.1.2.1.2.) zur Vermeidung bakterieller Kontamination mit je 0,2 ml einer Streptomycinsulfatlösung (0,5 mg/ml) bestrichen. Wenn nichts anderes gesagt ist, wird eine Amöbensuspension mit einer Zelldichte von etwa $1x10^7$ Zellen/ml 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 aufgetropft. Die Tropfen werden auf der Platte so verteilt, daß sie sich nicht berühren. Die Zellen werden bei 22 - 23°C unter konstanten Lichtverhältnissen der Differenzierung überlassen.

2.2.1.6. Herstellung von D. discoideum-Dauerkulturen

Es wird wie unter 2.2.1.5. beschrieben verfahren, jedoch beträgt die Zelldichte der aufgetropften Suspension etwa

1×10^8 Zellen/ml. Nachdem die Zellen vollständig zu Sporenträgern ausdifferenziert sind, werden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen bleiben die Sporen mindestens ein halbes Jahr keimungsfähig.

2.2.2. Analytische Methoden

2.2.2.1. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen werden mit Hilfe einer NEUBAUER-Kammer ausgezählt.

Zur Zählung der Zellen aus Hungerkulturen ist es notwendig, diese zunächst zu disagglutinieren. Dies gelingt bis zu etwa 8 h nach Beginn der Inkubation der Zellen im Hungermedium und wieder ab etwa 24 h nach Beginn des Hungers mit folgendem Puffer, der von TAKEUCHI et al. (32) zur Disaggregation von Schleimpilz-Pseudoplasmodien beschrieben wird: 0,01 M NaCl; 0,01 M KCl; 0,015 M TRIS-HCl (pH 7,3); 0,005 M EDTA-Na_2. Zwischen der 10. und 20. Stunde der Inkubation im Hungermedium gelingt eine Zerlegung der Zellaggregate in Einzelzellen mit diesem Puffer nicht. Das Gleiche gilt für einen weiteren von TAKEUCHI et al. (32) beschriebenen Puffer, der wie folgt zusammengesetzt ist: 0,05 M TRIS-HCl (pH 7,0); 0,0013 M BAL (2,3-Dimerkapto-1-Propanol); 0,02 M NaCl; 0,02 M KCl; 0,1 % Pronase.

Eine zuverlässige Zellzählung ist nach den vorliegenden Versuchen deshalb nur in den ersten und letzten Stunden des Experimentes möglich.

2.2.2.2. Bestimmung des Trockengewichtes

Die Zellen, deren Feuchtgewicht bestimmt wurde, werden anschließend bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Eine Gewichtskonstanz ist nach 20 h erreicht.

2.2.2.3. Messung der Atmungsaktivität

Nach verschiedenen Zeiten des Hungers der Zellen in flüssigem Medium wird die Atmungsaktivität bestimmt. Dies erfolgt mit einer CLARK-Elektrode (Oxygen Monitor YSI Modell 53 der Firma YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS CO, Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). Anschließend wird der Sauerstoffverbrauch in µl O_2/h je mg Zellproteins errechnet.

2.2.2.4. Messung des pH-Wertes im Außenmedium

Die Messung des pH-Wertes erfolgt nach Abzentrifugieren der Zellen im Überstand mit dem pH-Meter Typ PHM 26 (RADIOMETER, Kopenhagen).

2.2.2.5. Messung der UV-Absorption im Außenmedium

Die Amöben werden durch kurzzeitiges Zentrifugieren (500 x g, 1 min) mit der HETTICH-Tischzentrifuge UNIVERSAL II (HETTICH, Tuttlingen) abzentrifugiert. Der Überstand wird einer nochmaligen Zentrifugation mit derselben Zentrifuge 20 min bei 4 000 x g unterworfen. Anschließend werden 3,0 ml des Überstandes mit 3,0 ml 12 %iger eiskalter TCA 30 min im Eisbad behandelt.

Danach wird wieder 20 min bei 4 000 x g zentrifugiert. Mit dem BECKMAN SPECTROPHOTOMETER ACTA III wird die Lösung im Bereich der Wellenlänge von λ = 400 - 250 nm auf Absorptionsänderungen untersucht.

2.2.2.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von LOWRY et al. (33). Als Eichsubstanz dient Serumalbumin vom Rind (BEHRINGWERKE, Marburg).

2.2.2.7. Bestimmung der löslichen Kohlenhydrate (Glykogen)

Vorbereitung der Proben nach KEPPLER et al. (34):
Die nach Abtrennen vom Hungermedium tiefgefrorenen Zellen werden mit 2,0 ml kochendem destilliertem Wasser übergossen und sofort in ein siedendes Wasserbad überführt. Hier verbleiben sie 5 min. Während dieser Zeit werden die Proteine denaturiert. Anschließend werden die Zellen im Zellhomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM während 5 min aufgeschlossen. Grobe Zellfragmente werden durch Zentrifugation bei maximal 4 000 x g abgetrennt. Im Überstand werden die löslichen Kohlenhydrate, deren Hauptbestandteil das Glykogen darstellt, mit einer modifizierten Anthronmethode nach HODGE und HOFREITER als Menge der Glucoseäquivalente bestimmt (35).

Reagenz:
200,0 mg Anthron (9,10-dihydro-9-oxoanthracen) werden in 100,0 ml konzentrierter Schwefelsäure (Dichte: 1,84)

gelöst. Da diese Lösung nicht haltbar ist, wird sie vor Gebrauch frisch angesetzt.

Durchführung:

Die Proben und das Reagenz läßt man zunächst auf 10 - 15°C abkühlen. Anschließend werden 1,0 ml der kohlenhydrathaltigen Proben mit 2,0 ml des Anthronreagenzes vorsichtig unterschichtet. Alle Ansätze werden bis zum Durchmischen bei obengenannter Temperatur aufbewahrt. Nachdem alle Proben gleichzeitig durchmischt worden sind, werden sie 15 min in kochendem Wasserbad inkubiert. Anschließend werden sie sofort in kaltem Wasser abgekühlt. Nach 1 h wird die Extinktion bei einer Schichtdicke D = 1 cm und einer Wellenlänge von λ = 625 nm im ZEISS-Spektralphotometer PMQ II bestimmt. Von den gemessenen Werten wird ein Leerwert abgezogen. Der Leerwert enthält anstelle der kohlenhydrathaltigen Lösung Wasser.

Eichkurve:

Die Eichkurve, die mit Hilfe einer Glucoselösung bekannter Konzentration erstellt wird, zeigt, daß der Test in den untersuchten Grenzen von 0 - 40 µg Glucose je Ansatz linear ist. Einer Extinktionsdifferenz von ΔE = 0,096 entsprechen dabei 10 µg Glucose pro Ansatz (Abb. 3).

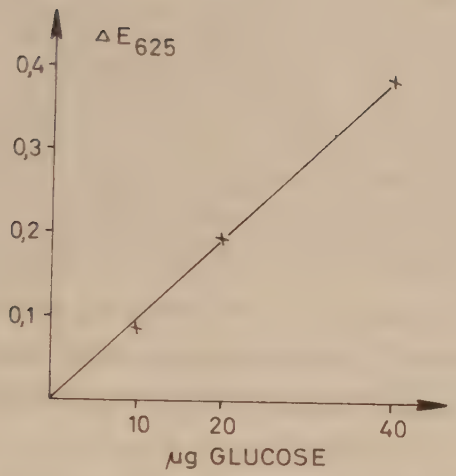


Abb. 3: Eichkurve zur Glucosebestimmung mit der Anthronreaktion

2.2.2.8. RNA-Bestimmung

Die Menge der extrahierten und gereinigten RNA (s.2.2.3.2.) wird durch Messung der Absorption λ = 260 nm im ZEISS-Spektralphotometer PMQ II bestimmt. Die Messung erfolgt bei einer Schichtdicke D = 1 cm.

Die Hauptmenge der extrahierten RNA (s. Abb. 21) ist rRNA. Die Basenverteilung in der rRNA von D. d i s c o i d e u m ist folgende: Adenin 24,1 %, Guanin 22 %, Cytosin 20,4 % und Uracil 33,6 % (26). Das mittlere Molekulargewicht für die Mononukleotide ist demnach 338 oder für die RNA etwa 320 x n (Wasserabspaltung!). Der mittlere molare Extinktionskoeffizient bei der genannten Basenverteilung berechnet sich für die Mononukleotide

zu $11{,}1 \times 10^3$ bei λ= 260 nm und pH 7,0 (36). Eine direkte Beziehung zwischen der UV-Absorption durch Nukleinsäuren und deren Konzentration ist jedoch nur nach deren Degradation herzustellen (36). Andernfalls findet man, bedingt durch hypochrome Effekte, zu niedrige Werte. Die RNA-Präparationen werden also zunächst während 24 h bei Raumtemperatur in 1 N NaOH inkubiert. Durch diese Behandlung wird die RNA in die Mononukleotide gespalten (37). Vor der Bestimmung der UV-Absorption wird die Lösung wieder auf pH 7,0 eingestellt, zunächst grob mit HCl und anschließend genau mit Phosphatpuffer (pH 7,0).

2.2.3. Extraktionsgänge

2.2.3.1. Fraktionierung der Zellbestandteile

Die Fraktionierung erfolgt im Prinzip nach dem Trennverfahren von SCHMIDT und THANNHAUSER (38) in der von ROBERTS et al. (39) für Bakterien modifizierten Form. Es findet wie nachfolgend beschrieben für die Fraktionierung von D. d i s c o i d e u m Anwendung:

1. Kalte TCA-Extraktion

Etwa 5×10^7 Zellen werden in 4,0 ml 5 %iger eiskalter TCA suspendiert und 30 min unter gelegentlichem Umschütteln im Eisbad stehengelassen. Anschließend wird 5 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vom Niederschlag abgetrennt. Die Menge des Überstandes wird bestimmt. In dieser Fraktion finden sich vor allen Dingen niedermolekulare Metaboliten.

2. Äthanolextraktion

Von dem oben erhaltenen Präzipitat wird alle anhaftende Flüssigkeit entfernt. Das Präzipitat wird in 4,0 ml 75 %igem Äthanol suspendiert und 30 min bei 50°C im Wasserbad extrahiert. Der bei der Zentrifugation anfallende Überstand enthält die "äthanollösliche Fraktion". In ihr findet man Lipide und äthanollösliche Proteine.

3. Äther-Äthanol-Extraktion

Das bei 2. anfallende Präzipitat wird in einer Mischung aus 2,0 ml Äther und 2,0 ml 75 %igem Äthanol suspendiert und 15 min bei 50°C im Wasserbad extrahiert. Der Überstand, der nach der Zentrifugation anfällt, enthält die "äthanol-äther-lösliche Fraktion". In dieser Fraktion finden sich die gleichen Bestandteile wie in der "äthanollöslichen Fraktion".

4. Heiße TCA-Extraktion

Das bei 3 anfallende Präzipitat wird in 4,0 ml 5 %iger TCA suspendiert und 30 min im siedenden Wasserbad extrahiert. Der Überstand der Zentrifugation enthält die "heiße TCA-Fraktion". Diese Fraktion enthält hauptsächlich Hydrolyseprodukte der Nukleinsäuren.

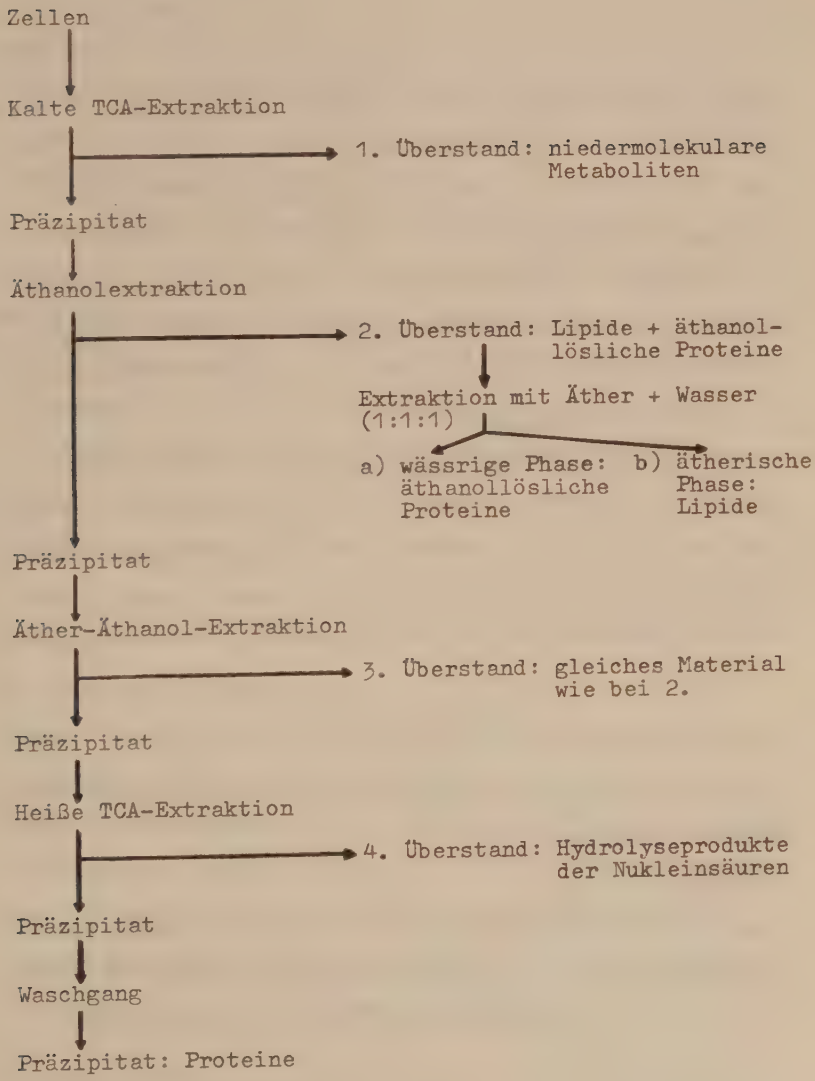
5. Waschgang

Das bei 4.anfallende Präzipitat wird nacheinander einmal mit 4,0 ml angesäuertem Äthanol (10,0 ml 75 %iges Äthanol werden mit 0,1 ml 1 N HCl gemischt) und einmal

mit 4,0 ml Äther TCA-frei gewaschen. Die hierbei anfallenden Waschflüssigkeiten enthalten nur unwesentliche Mengen Radioaktivität und werden verworfen. Das zurückbleibende Präzipitat stellt die Fraktion der Proteine dar.

6. Auftrennung der "äthanollöslichen Fraktion"
Von dem beim 2. Fraktionierungsschritt erhaltenen Überstand werden 3,0 ml entnommen. Nach Zusatz von 3,0 ml Äther und 3,0 ml Wasser wird der Ansatz gut durchgemischt. Die Ätherphase wird abpipettiert. Anschließend werden nochmals 3,0 ml Äther hinzugefügt, gemischt und die Ätherphase erneut abgetrennt. Die beiden Ätherphasen werden vereinigt. Sie enthalten die äthanol- und ätherlöslichen Bestandteile, nämlich die Lipide. Zurück bleiben die Bestandteile, die zwar äthanollöslich aber ätherunlöslich sind, nämlich die äthanollöslichen Proteine.

Fraktionierungsschema



2.2.3.2. Extraktion und Reinigung der RNA

Aufschluß der Proben

Der Aufschluß der Proben erfolgt modifiziert nach FIRTEL (40). Für eine Extraktion werden etwa 1 - $5x10^8$ Zellen von D. d i s c o i d e u m aufgeschlossen. Dazu werden die tiefgefrorenen (-20°C) Zellen mit insgesamt 4,0 ml eiskaltem Tris-Puffer (0,025 M, pH 8,0) in das eisgekühlte Aufschlußgefäß eines COLORA-Zellhomogenisators (System: POTTER-ELVEHJEM) überführt. Sofort werden 0,5 ml 20 %iger SDS-Lösung zugesetzt und 30 s bei 0°C homogenisiert. Anschließend werden 0,15 ml Diäthylpyrocarbonat zugesetzt,und eine Homogenisation von 1 min Dauer schließt sich an. (Diäthylpyrocarbonat und SDS hemmen die Aktivität der Ribonukleasen).
Die Zellhomogenate werden in eisgekühlte Schliffgefäße überführt.

Extraktionsgang

Es wird im wesentlichen nach der von GIRARD beschriebenen Methode verfahren (41).
a) Phenol 88 %ig
Das Phenol wird frisch destilliert und mit destilliertem Wasser auf 88 % (w/w) eingestellt. Die Lösung ist farblos. Sie wird vor Licht geschützt bei +4°C aufbewahrt.
b) Äthanol 95 %ig
Das Äthanol wird auf -20°C abgekühlt.

c) SDS-Lösung 10 %ig

SDS (Natriumdodecylsulfat) wird in destilliertem Wasser gelöst, so daß eine 10 %ige Lösung entsteht. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

d) Acetat-EDTA-Puffer pH 5,1

3,722 g EDTA (Na-Salz) und 1,361 g Natriumacetat werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst. Mit Essigsäure wird der pH-Wert 5,1 eingestellt. Anschließend wird mit destilliertem Wasser auf 1 000,0 ml aufgefüllt.

e) Acetat-EDTA-Puffer pH 5,1 mit 0,5 % SDS

0,5 g SDS werden in 99,5 ml Acetat-EDTA-Puffer pH 5,1 (siehe oben) gelöst.

f) 2 M NaCl-Lösung

21,925 g NaCl werden in destilliertem Wasser ad 200,0 ml gelöst.

g) Tris-SDS-Puffer pH 7,4

Dieser Puffer enthält in einem Endvolumen von 1 000,0 ml 5 g SDS (0,5 %), 5,844 g NaCl (0,1 M), 0,292 g EDTA (0,001 M) und 0,606 g Tris (0,005 M). Die Substanzen werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst,und der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt. Anschließend wird das Volumen mit destilliertem Wasser auf 1 000,0 ml ergänzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gehalten.

Phenolextraktion

Das Zellhomogenat (siehe oben) wird in einem Schliffgefäß mit 15,0 ml eiskaltem Acetat-EDTA-Puffer pH 5,1 verdünnt. Der Mischung werden 0,75 ml 10 %iger SDS-Lösung zugesetzt.

Nachdem noch 15,0 ml 88 %iges Phenol hinzugefügt wurden, wird der ganze Ansatz 3 min unter Schütteln im Wasserbad bei 60°C extrahiert. Es ist darauf zu achten, daß der Stopfen des Gefäßes gut geschlossen ist.

Nach der Extraktion im heißen Wasserbad werden die Proben unter vorsichtigem Schütteln in einem Eisbad schnell abgekühlt. Die phenolische Phase wird von der wässrigen durch Zentrifugieren bei 4°C während 4 min bei 1.000 x g getrennt. Die phenolische (untere) Schicht wird verworfen. Die weißliche Interphase wird bei der wässrigen belassen. Die Prozedur wird durch erneutes Zufügen von 10,0 ml Phenollösung wiederholt. Diesmal wird aber nur 2 min bei 60°C extrahiert. Anschließend wird wieder wie beschrieben abgekühlt und zentrifugiert. Der dritte Extraktionsschritt wird mit 7,0 ml Phenollösung 2 min bei 60°C durchgeführt. Nach Abkühlen und Zentrifugieren wird die wässrige (obere) Schicht abgehebert und im Eisbad aufbewahrt. Die Interphase und die obere Schicht der Phenolphase werden nun mit 3,0 ml Acetat-EDTA-Puffer pH 5,1, der 0,5 % SDS enthält, bei Raumtemperatur ausgeschüttelt. Nach der anschließenden Zentrifugation wird die resultierende wässrige Phase mit der vorher erhaltenen vereinigt und einer nochmaligen Zentrifugation während 10 min bei 4°C und 1.000 x g unterworfen. Dabei eventuell noch abgeschiedene phenolische Phase wird sorgfältig abgetrennt. Die Menge der wässrigen Phase wird bestimmt, und die darin gelöste RNA durch Äthanol ausgefällt.

Äthanolfällung

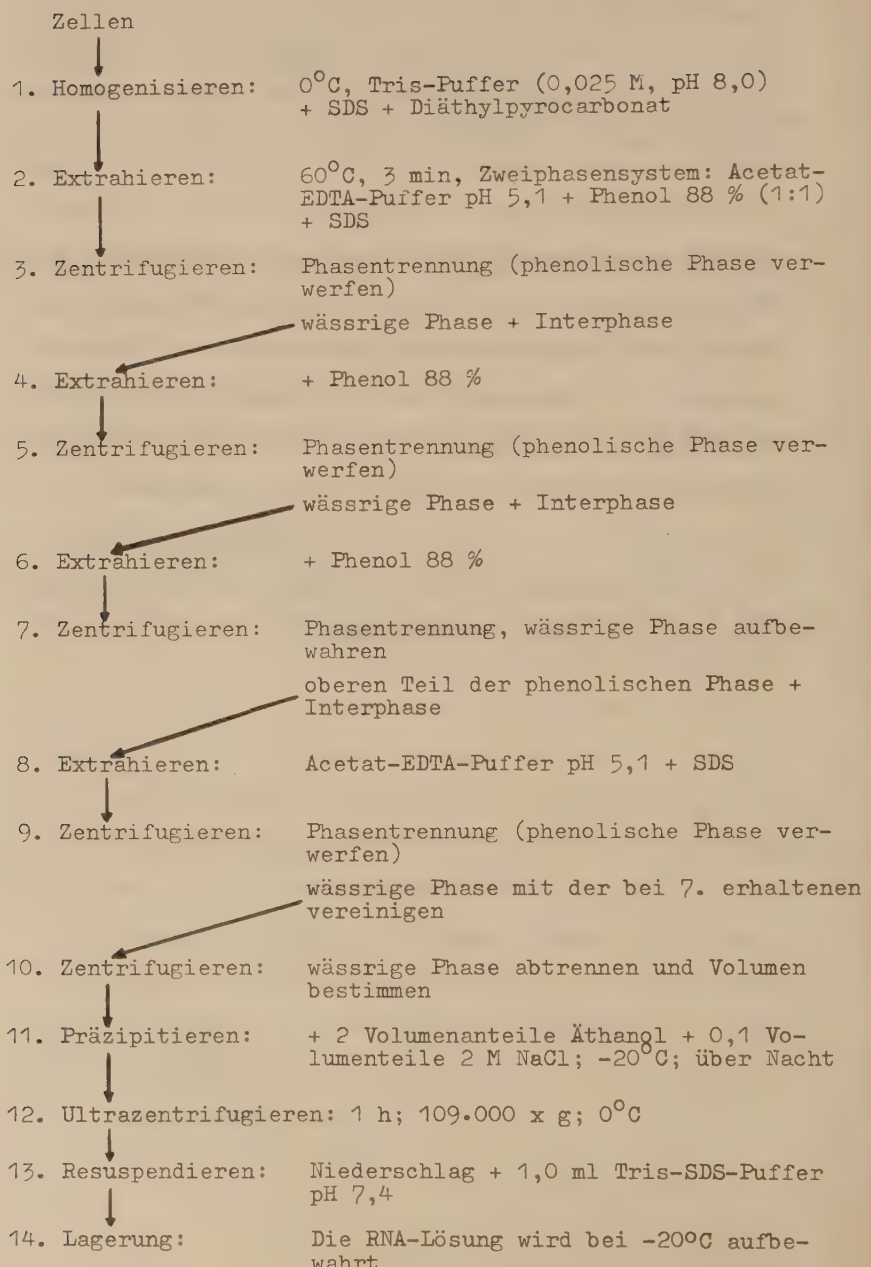
Der jeweiligen wässrigen Phase (die Menge entspricht 1,0 Volumenteile) werden 0,1 Volumenteile 2 M NaCl-Lösung und 2,0 Volumenteile 95 %iges Äthanol (-20°C) zugesetzt. Der Ansatz wird gut durchgemischt und dann während 24 h der Fällung bei -20°C überlassen.

Ultrazentrifugation

In der Ultrazentrifuge wird das erhaltene Präzipitat von dem Überstand getrennt. Hierzu wird die "INTERNATIONAL PREPARATIVE ULTRAZENTRIFUGE, MODEL B 60" von IEC eingesetzt. Mit dem zugehörigen Festwinkelrotor, Typ A-109 wird die Zentrifugation 1 h bei 0°C bis 2°C und einer maximalen Beschleunigung von 109.000 x g durchgeführt.

Der Überstand wird verworfen. Der Niederschlag wird in 1,0 ml Tris-SDS-Puffer pH 7,4 gelöst. Die so erhaltene RNA-Lösung wird bei -20°C aufbewahrt.

Isolierung von RNA



2.2.4. Dichtegradientenzentrifugation

a) Herstellung der Saccharoselösungen

15 %ige Saccharoselösung (w/w)

15,0 g Saccharose (Qualität für die Dichtegradientenzentrifugation, MERCK) werden in 85,0 g Tris-SDS-Puffer pH 7,4 (siehe 2.2.3.2.) gelöst. Die Lösung zeigt einen Brechungsindex von 1,3582.

30 %ige Saccharoselösung (w/w)

30,0 g Saccharose werden in 70,0 g Tris-SDS-Puffer pH 7,4 gelöst. Die Lösung zeigt einen Brechungsindex von 1,3842.

b) Herstellung der Gradienten

In die Kammer I des Gradientenmischgerätes (Abb. 4) werden 6,0 ml der 30 %igen, in Kammer II 6,0 ml der 15 %igen Saccharoselösung einpipettiert. Die Mischfeder S in Kammer I wird gleichmäßig auf und ab bewegt. Das Ventil zwischen den beiden Kammern wird geöffnet. Die resultierende Lösung fließt nach Öffnen des Ventils V in das Zentrifugenröhrchen ab. Der Aufbau eines Gradienten dauert etwa 30 min.

c) Zentrifugation

Auf die Gradienten werden 0,02 - 0,1 ml der RNA-Lösung (siehe 2.2.3.2.) aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgt in der Ultrazentrifuge von IEC, Modell B 60. Es wird der zugehörige Ausschwingrotor 488, Type SB-283 eingesetzt. Zentrifugiert wird 36 h bei 82.000 x g und 20°C. (Bei tieferen Temperaturen fällt SDS in den Gradienten-Lösungen aus).

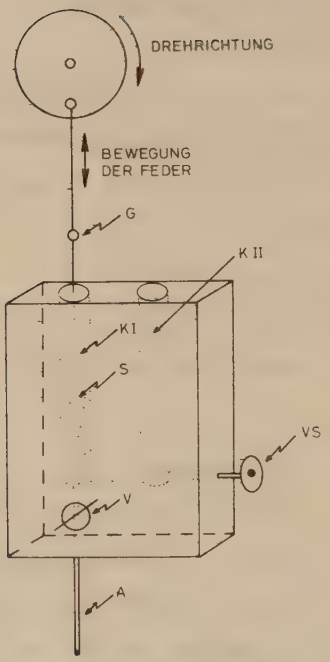


Abb. 4: Gradientenmischgerät
Abkürzungen:
A = Abflußrohr; G = Gelenk; K I = Vorratskammer für 30 %ige Saccharoselösung und Mischkammer;
K II = Vorratskammer für 15 %ige Saccharoselösung;
V = Ventil zur Freigabe des Abflusses;
VS = Ventilschraube zum Öffnen der Verbindung zwischen den Kammern.

d) Untersuchung der Linearität der Gradienten

Nach erfolgter Zentrifugation unter den beschriebenen Bedingungen wird die Linearität der Gradienten untersucht, indem die Brechungsindices der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Abb. 5 zeigt, daß die Gradienten linear sind.

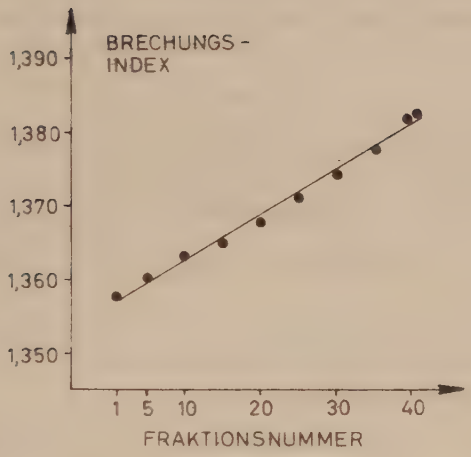


Abb. 5: Kontrolle der Linearität des Saccharosegradienten durch Bestimmen der Brechungsindices nach erfolgter Zentrifugation.

e) Auswertung der Gradienten

Nach Beendigung der Ultrazentrifugation werden die Gradienten mit dem "Gradientenscanner" Modell 2480 von GILFORD (Oberlin, USA) und dem angeschlossenen GILFORD-Spectrophotometer, Modell 240 bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm durchgemessen. Die Absorption wird mit dem GILFORD-Schreiber, Modell 1100 festgehalten. Der Gradient wird mit 40 %iger Saccharoselösung, die mit 20,0 mg Trypanblau/100,0 g Saccharoselösung gefärbt ist, von unten aus dem Zentrifugenröhrchen herausgedrückt. Nach dem Passieren der Meßküvette wird der Gradient in Portionen von 20 Tropfen je Glas fraktioniert. Ein Gradient ergibt 44 - 48 Fraktionen.

Die ausgetropften Fraktionen werden zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung und der Brechungsindices verwendet.

2.2.5. Auftrennung der RNA an Poly(U)-Sepharose

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie wird Poly(A)-haltige RNA von den anderen Arten über Poly(U)-Sepharose-Säulen abgetrennt.
Angewandt wird eine von HENDLER et al. (42) beschriebene, wie folgt abgewandelte Methode:
Zunächst wird die Poly(U)-Sepharose in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration (400 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 0,2 % SDS) äquilibriert. Die äquilibrierte Poly(U)-Sepharose wird auf eine Säule gegeben und mit obigem Puffer gewaschen. Die Temperatur des Säulenmaterials wird bei 25°C konstant gehalten. Aufgetragen wird die RNA-Lösung nach Verdünnen (1:4) mit oben genanntem Puffer. Nachdem die aufgetragene Flüssigkeit nahezu vom Säulenbett aufgenommen ist, gibt man der RNA zur Ausbildung der Bindungen 10 min Zeit. Anschließend wird mit 20 ml des genannten Puffers eluiert. Fraktionen von je 2,0 ml werden gesammelt. Es folgt eine Elution mit einem Formamidpuffer (90 % Formamid; 2 mM EDTA; 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,5). Wieder werden Fraktionen zu je 2,0 ml gesammelt. In allen Fraktionen wird die Radioaktivität bestimmt.

2.2.6. Arbeiten mit radioaktiv markierten Substanzen

2.2.6.1. Einbau radioaktiv markierter Substanzen

Die Zellen werden nach einer Vorinkubationszeit von 30 min mit den Antibiotika (siehe 3.6.1.1. und 3.6.2.1.) entweder mit (5,6-^{3}H)-Uracil (44 Ci/mmol) bzw. (2-^{14}C)-Uracil (59 mCi/mmol) oder (^{32}P)-Orthophosphat zur Markierung der RNA und mit (1-^{14}C)-Leucin (59 mCi/mmol) zur Markierung der Proteine in flüssigem Medium inkubiert. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen der radioaktiv markierten Substanzen sind ebenso wie die Zellkonzentrationen im Ergebnisteil bei den entsprechenden Versuchen genannt.

2.2.6.2. Behandlung der radioaktiv markierten Zellen

Die radioaktiv markierten Zellen werden entweder einem der beschriebenen Extraktionsgänge unterworfen (siehe 2.2.3.), oder sie werden 30 min lang unter häufigem Umschütteln mit kalter (im Eisbad) bzw. heißer (im siedenden Wasserbad) 5 %iger TCA behandelt. Soll der Einbau von radioaktiv markiertem Uracil bestimmt werden, so werden der TCA 0,2 mg unmarkiertes Uracil/ml zugesetzt. Dagegen werden der TCA 10,0 mg unmarkiertes Leucin/ml zugesetzt, wenn der Einbau von markiertem Leucin untersucht werden soll. Die Präzipitate werden vom Überstand durch Absaugen über Membranfilter abgetrennt. Anschliessend wird zweimal mit 5 %iger kalter TCA nachgewaschen. Die Membranfilter werden nach dem Waschen bei 37°C mindestens 12 h getrocknet. Besonderheiten für die Analyse

des mit (^{32}P)-Orthophosphat markierten Zellmaterials werden in 2.2.6.3. dargestellt.

2.2.6.3. Verwendung von silanisierten Glasfaserfiltern

Orthophosphat hat die unangenehme Eigenschaft, sowohl an Membranfilter (in gleichem Maße an Zelluloseacetat- wie an Zellulosenitratfilter), als auch an herkömmliche Glasfaserfilter zu binden. Die Menge an gebundenem (^{32}P)-Orthophosphat beträgt bis zu 5 % des Angebots. Sie ist der eingesetzten Menge direkt proportional. (Eigene, hier nicht näher beschriebene Untersuchungen).
Um die Bindung des (^{32}P)-Orthophosphats an die Glasfaserfilter herabzusetzen, werden diese silanisiert. Als Silanisierungsmittel dient Dimethyldichlorsilan $[(CH_3)_2SiCl_2]$.

Vorgang: WHATMAN-Glasfaserfilter GF/C werden 1 h bei Raumtemperatur in einer Dimethyldichlorsilanlösung (5 % in Toluol) inkubiert. Anschließend werden die Filter dreimal mit Äthanol gewaschen und bei 40°C getrocknet.

Die TCA-Behandlung des mit (^{32}P)-Orthophosphat markierten Zellmaterials weicht von (2.2.6.2.) ab. Gefällt wird das Zellmaterial in eiskalter 10 %iger TCA mit einem Zusatz von 1 % K_2HPO_4, 1 % $Na_4P_2O_7$ und 0,01 M EDTA. Mit der gleichen TCA-Lösung wird auch nachgewaschen, und zwar jeweils mit 20 ml in Portionen zu 2,0 ml, 3,0 ml, 5,0 ml und 10,0 ml nacheinander.

Versuche mit (^{32}P)-Orthophosphat zeigen, daß bei Verwendung von silanisierten Glasfaserfiltern in Verbindung mit dem oben beschrieben Fällungs- und Nachwaschverfahren die unspezifische Bindung von (^{32}P)-Orthophosphat an die Filter auf 0,03 % - bezogen auf die eingesetzte Menge (^{32}P)-Orthophosphat - herabgesetzt wird.

2.2.6.4. Messung der Radioaktivität

Als Szintillatorgemisch wird ein "ANPO"-Szintillator folgender Zusammensetzung verwendet:

Naphthalin	348,00 g
2-(Naphthyl-(1))-5-phenyloxazol (ANPO)	222,00 mg
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	22,20 mg
Äthanol (absolut)	1,00 l
Dioxan (wasserfrei, peroxidfrei)	1,67 l
Xylol	1,67 l

Das Dioxan wird über KOH getrocknet und über $FeSO_4$ destilliert.

Zu je 8,0 ml des flüssigen Szintillatorgemisches werden 0,005 bis 0,2 ml der flüssigen Probe gegeben. Im gleichen Szintillatorgemisch wird auch die Radioaktivität (^{3}H)- und (^{14}C)-markierten Zellmaterials auf Membranfiltern bestimmt. Dazu werden die Filterplättchen in die Szintillatorflüssigkeit eingebracht. Die Radioaktivität des mit (^{32}P)-Orthophosphat markierten Zellmaterials auf Membranfiltern und silanisierten Glasfaserfiltern wird dagegen im Fertigszintillator Permablend III (PACKARD) bestimmt.

Die Messungen der Radioaktivität erfolgen in dem Flüssigkeitsszintillationszähler TRI-CARB, Modell 3380 der Firma PACKARD. Die Zählausbeute beträgt bei den benutzten Kanaleinstellungen für ^{3}H 37,0 %, für ^{14}C 90,4 % und für ^{32}P 82,8 %. Die Zähldauer wird je nach Menge der zu erwartenden Zählimpulse zwischen 1 min und 5 min gewählt.

2.2.7. Photographische Methoden

Die Differenzierungsvorgänge werden photographisch festgehalten. Dazu werden die Agarplatten mit den der Differenzierung überlassenen Amöben in bestimmten Zeitabständen photographiert.

Auf das Stereomikroskop WILD M7 (WILD, Heerbrugg) wird eine Kleinbildkamera LEICA MDa (LEITZ, Wetzlar) mit Mikroansatz zur LEICA montiert. Mikroansatz und Mikroskop werden durch einen Adapter miteinander verbunden. Die Belichtungszeit wird mit dem Belichtungsmesser MICROSIX-L (LEITZ, Wetzlar) im Meßstutzen des Mikroansatzes ermittelt. Die Ausleuchtung der Platten erfolgt im Durchlicht mit einer Niedervoltlampe bei 5,5 V. Als Film dient der 9 DIN ORTHO von AGFA.

Die gewählte Mikroskopvergrößerung ist 60-fach. Die ermittelte Belichtungszeit beträgt 2 s.

2.3. Herkunft der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Nährböden

BEHRINGWERKE AG, Marburg
Serumalbumin vom Rind

BOEHRINGER Mannheim GmbH, Mannheim
Streptomycinsulfat und Rifampicin

DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Agar

FLUKA AG, Buchs, St. Gallen, Schweiz
Diäthylpyrocarbonat

OXOID LTD., London, Großbritannien
Bacteriological Peptone und Corn-Meal

PACKARD Instrument GmbH, Frankfurt (Main)
Permablend III; 2,5-Diphenyloxazol (PPO);
2-(1-Naphthyl)-5-Phenyloxazol (ANPO)

THE RADIOCHEMICAL CENTRE LTD. Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
(1-^{14}C)-Leucin (59 mCi/mmol)
(2-^{14}C)-Uracil (59 mCi/mmol)
(5,6-^{3}H)-Uracil (44 Ci/mmol)
(^{32}P)-Orthophosphat (50 - 140 Ci/mg P)

SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Trypanblau; Pronase; 2,3-Dimerkaptopropanol (BAL) und Morpholinoäthansulfonsäure (MES)

E. MERCK AG, Darmstadt
Die übrigen Chemikalien wurden von dieser Firma als p.a. Substanzen bezogen

3. ERGEBNISSE

3.1. Vermehrung von D. discoideum

Die Amöben werden wie beschrieben (2.1.2.1.3.), in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 auf E. c o l i B/2 angezüchtet. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer NEUBAUER-Kammer nach bestimmten Zeiten ermittelt. Der Mittelwert aus je 4 Zählungen wird bestimmt und die Standardabweichung errechnet. Die Werte sind in der Wachstumskurve (Abb. 6) dargestellt.

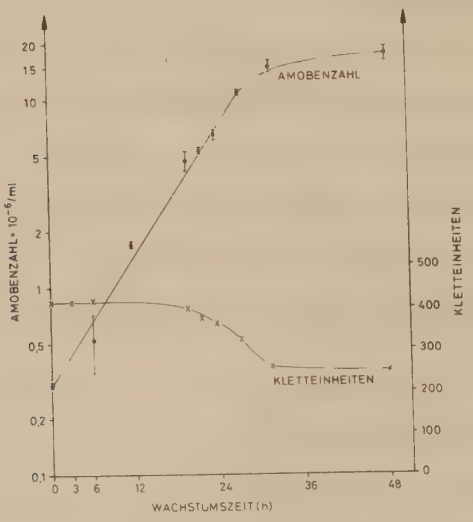


Abb. 6: Vermehrung von D. discoideum NC-4 unter Phagozytose von E. coli B/2 in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 bei 23°C. Die Suspension enthält zu Beginn etwa 10^{10} Bakterien/ml und 3 x 10^{5} Amöben/ml. Trübungsänderungen der Suspension in KLETT-Einheiten (x——x); Amöbenzahl/ml (●——●) (Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 4 Zählungen).

Parallel dazu wird das Wachstum durch Trübungsmessungen mit dem KLETT-Colorimeter verfolgt. Die Trübungsänderungen der wachsenden Kultur sind ebenfalls in Abb. 6 dargestellt. Bei der Vermehrung der Amöben gehen zwei gegenläufige Trübungsänderungen vor sich. Die Bakterienzahl nimmt infolge der Phagozytose durch die Amöben ab; die Trübung wird geringer. Andererseits wächst die Zahl der Amöben, was eine Zunahme der Trübung zur Folge hat. Insgesamt überwiegt jedoch die durch die Abnahme der Bakterien bedingte Trübungsverminderung. Durch Trübungsmessungen mit dem KLETT-Colorimeter lassen sich recht einfach die letzten Stunden der logarithmischen Wachstumsphase verfolgen. Der Eintritt der Kultur in die stationäre Phase wird deutlich. Zur Bestimmung der Zellzahl dagegen ist diese Methode schlecht geeignet. Hierzu wird die NEUBAUER-Kammer zu Hilfe genommen.
Die Kultur wächst unter den gegebenen Bedingungen bis zu einer Amöbendichte von ungefähr 1×10^7 Amöben/ml logarithmisch. Es folgt eine Phase verminderter Vermehrung, ehe die stationäre Phase etwa bei $1{,}5 - 2 \times 10^7$ Amöben/ml erreicht wird.

3.2. Konstanz der Zellzahl im flüssigen Hungermedium

Werden Zellen von D. d i s c o i d e u m im flüssigen Hungermedium unter den in 2.2.1.4. genannten Bedingungen inkubiert, so ist, wie Abb. 7 zeigt, innerhalb von 24 h nur eine sehr geringe Abnahme der Zellzahl

festzustellen. Legt man die ermittelte Regressionsgerade ($y = 8{,}97 \cdot 10^6 + (-0{,}013 \cdot 10^6)x$) zugrunde, so berechnet sich für den Zeitraum von 24 h eine Zellzahlabnahme von 3,5 %. Dieser geringe Zellschwund bleibt für die folgenden Stoffwechseluntersuchungen unberücksichtigt. Aus Abb. 7 geht auch hervor, daß während der ersten Stunden der Inkubation keine meßbare Vermehrung der Zellen auftritt.

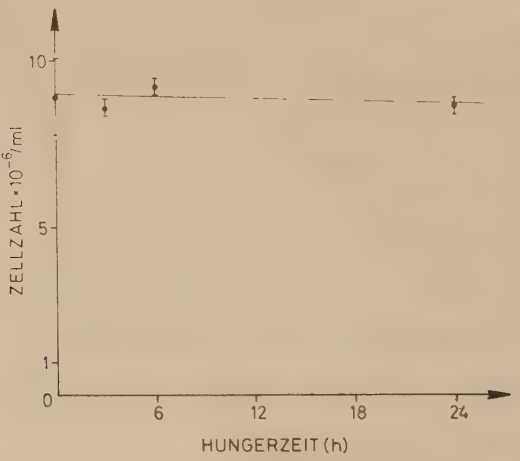


Abb. 7: Konstanz der Zellzahl im Hungermedium. Eingetragen sind Mittelwerte aus je 4 Zellzählungen in der NEUBAUER-Kammer mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Gerade ist die berechnete Regressionsgerade.

Für den Zeitraum zwischen 8 h und 20 h des Hungers waren Zellzahlbestimmungen nicht möglich. Es gelang in den durchgeführten Versuchen nicht, die Zellen zu disaggregieren (vgl. 2.2.2.1.).

3.3. Ablauf der morphologisch sichtbaren Differenzierung von D. discoideum nach verschiedenen Zeiten der Inkubation im Hungermedium

Amöben von D. d i s c o i d e u m werden abzentrifugiert, gewaschen und im Hungermedium (0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0) zu einer Zelldichte von etwa $1x10^7$ Zellen/ml resuspendiert. Zur Vermeidung bakterieller Kontamination wird Streptomycinsulfat in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt. Ein Teil dieser Suspension wird sogleich auf Phosphat-Agar-Platten ausgetropft. Die auf diesen Platten differenzierenden Zellen dienen als Kontrolle.

Die übrigen Zellen werden über 4, 6, 8, 10 und 12 h im Hungermedium geschüttelt. Nach den angegebenen Zeiten werden jeweils einige Tropfen der Suspension auf Phosphat-Agar-Platten übertragen. Der Differenzierungszyklus auf fester Oberfläche kann beginnen. Die differenzierenden Zellen werden unter konstanten Lichtverhältnissen (senkrecht auffallendes Neonlicht) bei 23°C gehalten.

Der zeitliche Ablauf der morphologischen Differenzierung auf den Platten wird photographisch festgehalten. Abb. 8 zeigt den Ablauf der Differenzierung der Zellen auf fester Oberfläche, die 0, 4 und 6 h im Hungermedium inkubiert wurden. Das erste Bild jeder Serie ist 30 min nach dem Auftropfen der Zellen auf die Agarplatte aufgenommen. Abb. 9 faßt die Bildserie (Abb. 8) noch einmal schematisch zusammen und enthält außerdem den Ablauf der

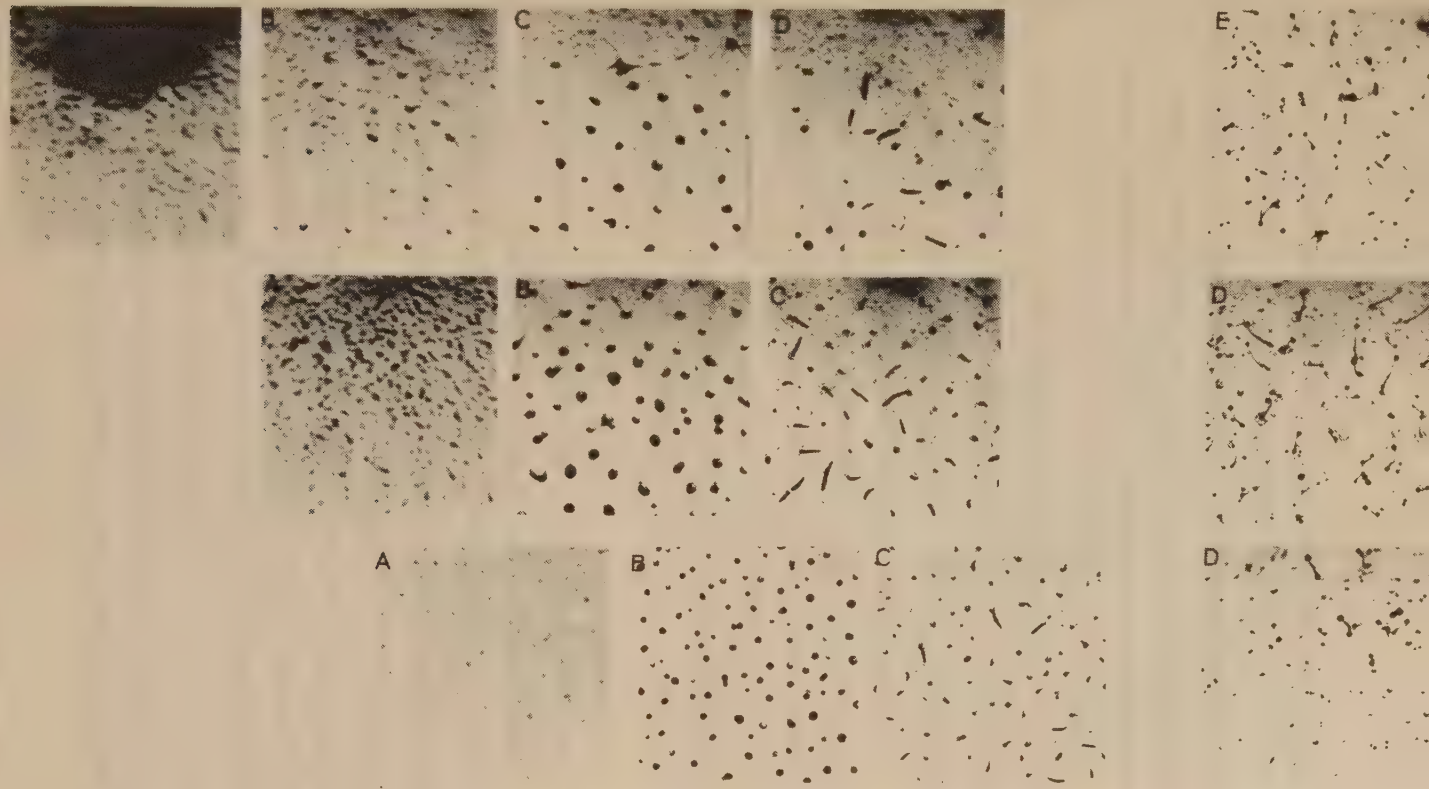


Abb. 8: Differenzierung von D. discoideum auf fester Oberfläche nach verschiedenen Zeiten der Inkubation im Hungermedium.
Hungerzeit im flüssigen Medium: Serie I: 0 h, II: 4 h, III: 6 h; Zeit der photographischen Aufnahmen seit Hungerbeginn: Serie I: Bild A: 30 min, B: 4 h, C: 8 h, D: 12 h, E: 24 h, Serie II: Bild A: 4,5 h, B: 8 h, C: 12 h, D: 24 h, Serie III: Bild A: 6,5 h, B: 10 h, C: 14 h, D: 24 h

Differenzierung derjenigen Zellen auf fester Oberfläche, die 8, 10 und 12 h im Hungermedium geschüttelt wurden. Folgendes wird deutlich: Die Zellen, ob sie nun 0 h, 4 h, 6 h oder 8 h im flüssigen Medium inkubiert werden, erreichen nach 24 h Gesamtzeit (Summe aus Inkubationszeit und Differenzierungszeit auf fester Oberfläche) das Stadium des reifen Sporenträgers. Bei Zellen, die nach 10 und 12 h auf die feste Oberfläche übertragen werden, dauert die Ausbildung reifer Sporenträger insgesamt etwa 26 h. Der Zeitraum des Differenzierungszyklus von der Migrationsphase bis hin zum reifen Sporenträger, der immer auf fester Oberfläche abläuft, bleibt auffällig konstant. Er beträgt zwischen 10 und 12 h. Der Zeitraum vom Auftragen der Zellen auf die feste Oberfläche bis zum Erreichen der Migrationsphase wird jedoch umso kürzer, je länger die Zellen im Hungermedium geschüttelt wurden. Er beträgt 12 h, wenn die Zellen sofort auf die feste Oberfläche übertragen werden (Kontrolle = Serie I). Nach 10 h der Inkubation in flüssigem Medium wird die Migrationsphase schon 4 h nach Übertragen der Zellen auf die feste Oberfläche erreicht. Der Ablauf des Abschnittes des Differenzierungszyklus auf fester Oberfläche, der der Migrationsphase vorausgeht, wird demnach durch die Inkubation im flüssigen Hungermedium stark verkürzt.

Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, daß schon während der Inkubationszeit im flüssigen Hungermedium in den Zellen Vorgänge ablaufen, die für den späteren Ablauf der

Differenzierung auf fester Oberfläche von entscheidender Bedeutung sind. Diese Vorgänge sollten sich durch Veränderungen von Stoffwechselgrößen zeigen.

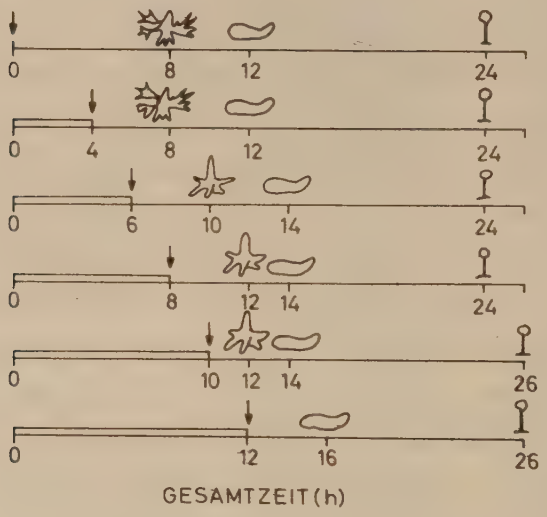


Abb. 9: Schematische Darstellung des Ablaufs der Differenzierung von D. d i s c o i d e u m auf fester Oberfläche nach verschiedenen Zeiten der Inkubation im flüssigen Hungermedium.

Zeitraum der Inkubation im Hungermedium

Zeitpunkt des Übertragens der Zellen auf feste Oberfläche

Aggregationsphase

späte Aggregationsphase

Migrationsphase

reifer Sporenträger

3.4. Physikalisch meßbare Veränderungen in den Zellen und im Medium

Wesentliche Schlüsse über die Stoffwechsellage von Zellen kann man aus Messungen des Sauerstoffverbrauches ziehen. In den hier durchgeführten Untersuchungen an Zellen im flüssigen Hungermedium konnte nachgewiesen werden, daß die Zellatmung, - dargestellt als Sauerstoffverbrauch je mg Zell-Protein in 1 h -, im Hungerzeitraum von 6 - 20 h um etwa 50 % abnimmt (siehe Abb. 10).

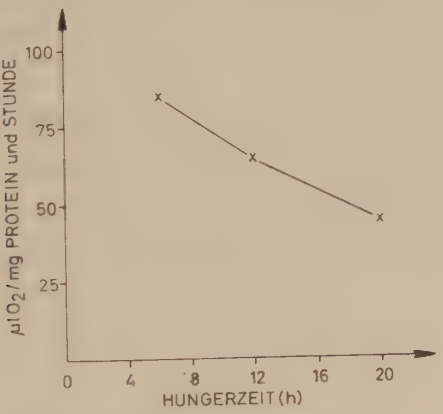


Abb. 10: Sauerstoffaufnahme der Zellen während der Inkubation im flüssigen Hungermedium. Eingezeichnet sind Mittelwerte zweier Bestimmungen.

Berücksichtigt man (siehe 3.5.), daß der Proteingehalt der Zellen während des Hungers stark abfällt, so ergibt sich, daß die Sauerstoffaufnahme pro Zellzahl mit fortschreitendem Hunger einem noch wesentlich stärkeren Abfall unterliegt. Bestimmungen der Zellzahl während der Hungerphase zeigen, daß die Zahl der lebenden Zellen

während des untersuchten Zeitraums konstant bleibt. Ein Abfall der Atmungsgröße durch partiellen Zelltod kann daher ausgeschlossen werden.

Atmung weist immer auf den Verbrauch von Reservestoffen hin. Da die Zellen in einem Hungermedium geschüttelt werden, also ohne neue Nahrungszufuhr auskommen müssen, muß sich bei ihnen eine negative Bilanz von Zellinhaltsstoffen zeigen. Genauere Daten zu dieser Überlegung folgen in den nächsten Kapiteln.

Auffällig ist weiterhin, daß Zellen, die im flüssigen Hungermedium geschüttelt werden, Substanzen ausscheiden, die im langwelligen UV-Bereich Licht absorbieren. Das Absorptionsmaximum dieser Substanzen liegt bei λ = 328 nm. Die Ausscheidung dieser Stoffe erfolgt vorwiegend zwischen der neunten und der sechzehnten Stunde nach Beginn der Inkubation im Hungermedium (siehe Abb.11).

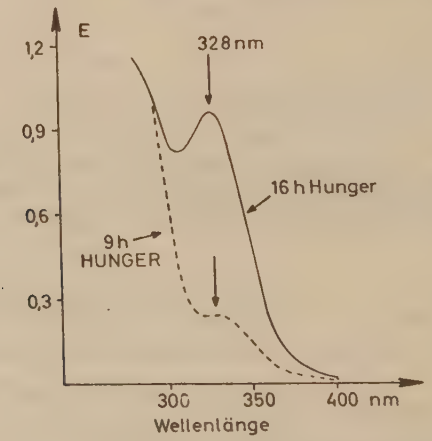


Abb. 11: UV-Absorption von Metaboliten, die ins Hungermedium abgeschieden werden. Das Kulturfiltrat wird mit 12 %iger kalter TCA (1:1) 30 min behandelt. Nach der Zentrifugation wird die UV-Absorption gemessen.

In späteren Stadien (in Abb. 11 nicht gezeigt) treten keine wesentlichen Änderungen mehr ein. Die UV-absorbierenden Substanzen sind nicht mit Trichloressigsäure fällbar. Weiter ist über die Natur dieser Substanzen bisher nichts bekannt. Als weitere Beobachtung sei angeführt, daß das gepufferte Hungermedium während der Inkubation der Zellen schwach alkalisch wird.

3.5. Veränderungen im Trockengewicht, im Protein- und RNA-Gehalt sowie im Anteil der löslichen Kohlenhydrate (Glykogen).

Das Trockengewicht wird wie unter 2.2.2.2. beschrieben bestimmt. Innerhalb von 24 h zeigen Zellen von D. d i s c o i d e u m, die in flüssigem Hungermedium inkubiert werden, eine starke Abnahme des Trockengewichtes. Bestimmt man zu Beginn des Hungers ein Trockengewicht von 13,8 mg/10^8 Zellen, so findet man nach 24 h 9,1 mg/10^8 Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen. Die Standardabweichung liegt in allen Fällen unter $\pm$ 0,4 mg/10^8 Zellen (siehe auch Abb. 12). Innerhalb von 24 h nimmt das Trockengewicht um etwa 35 % ab.

Ein großer Teil der Trockengewichtsabnahme ist durch die Abnahme des Proteingehaltes der Zellen bedingt. Zu Beginn des Hungers werden im Mittel 8,4 mg Protein/10^8 Zellen (s = $\pm$ 0,46 mg/10^8 Zellen) gefunden, nach 24 h im Mittel noch 5,7 mg Protein/10^8 Zellen (s = $\pm$ 0,4/10^8 Zellen) (Abb. 12). (Die Mittelwerte und Standardabwei-

chungen (s) sind aus jeweils drei voneinander unabhängigen Bestimmungen errechnet worden). Die Abnahme des Proteingehalts innerhalb von 24 h beträgt etwa 32 %.

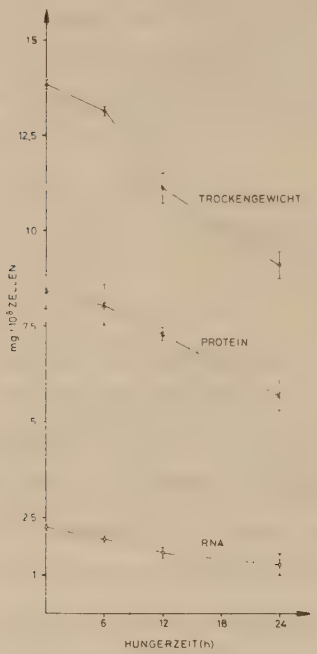


Abb. 12: Veränderungen des Trockengewichts (●——●), des Proteingehalts (x——x) und des RNA-Gehalts (o——o) in mg/10^8 Zellen. Eingetragen sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Abnahme von Trockengewicht und Proteingehalt laufen also nahezu parallel. Der Anteil des Proteins am Trockengewicht ist ungefähr 60 %.

Die Abnahme des Zellproteins kann im wesentlichen durch zwei Prozesse bedingt sein: erstens durch Abbau der Proteine im Zellstoffwechsel (hierauf wird später einge-

gangen) und zweitens durch Abgabe von Proteinen an das Medium. Proteine, die ans Medium abgegeben werden, können nach Abzentrifugieren der Zellen im Überstand bestimmt werden. Nach 6 h ist in der Kulturflüssigkeit noch kein Protein nachweisbar; nach 12 h sind etwa 9 % des Gesamtproteins in der Kulturflüssigkeit zu finden. Hieraus folgt, daß in den ersten 6 h der Inkubation weder eine Lysis von Zellen noch eine Abgabe meßbarer Mengen Proteins an das Medium erfolgt. Später sind dagegen extrazellulär geringe Mengen von Protein nachweisbar, die zum größeren Teil durch Sekretion freigesetzt werden, da, wie Untersuchungen der Zellzahlkonstanz (siehe 3.2.) zeigen, nur ein geringer Teil der Zellen (in 24 h etwa 3,5 %) lysiert.

Die Gesamtbilanz der RNA in den Zellen während der Hungerzeit ändert sich in ähnlicher Weise wie die des Trockengewichtes und des Proteinanteils. Die Bestimmung der RNA erfolgt, wie unter 2.2.2.8. beschrieben, durch Messung der UV-Absorption bei λ = 260 nm nach Denaturierung der extrahierten und gereinigten RNA mit 1 N NaOH. Bei quantitativen Bestimmungen finden vor allem die ribosomalen RNA-Arten, die den größten Teil der zellulären RNA darstellen, Beachtung.

Die Ergebnisse der RNA-Bestimmung in Zellen mit zunehmendem Hunger zeigt ebenfalls Abb. 12. Der RNA-Gehalt nimmt hier von 2,25 mg RNA/10^8 Zellen (s = $\pm$ 0,07 mg RNA/10^8 Zellen) auf 1,3 mg RNA/10^8 Zellen (s = $\pm$ 0,28 mg

RNA/10^8 Zellen) ab. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus jeweils zwei unabhängigen Versuchsreihen. Der Abfall des RNA-Gehalts während 24 h der Inkubation im Hungermedium beträgt demnach etwa 42 %.

Neben Proteinen und RNA kommen in den Zellen als weitere makromolekulare Bestandteile Polysaccharide vor. Glykogen ist ein lösliches Polysaccharid und stellt den Hauptbestandteil dieser Stoffklasse in Zellen von D. d i s c o i d e u m bis zur Aggregationsphase dar (23). Sollte der Glykogenpool zur Energiegewinnung während des Hungers herangezogen werden, so wäre eine rasche Abnahme der Gesamtmenge an löslichem Kohlenhydrat die Folge. Daß dies nicht der Fall ist, zeigt Abb. 13.

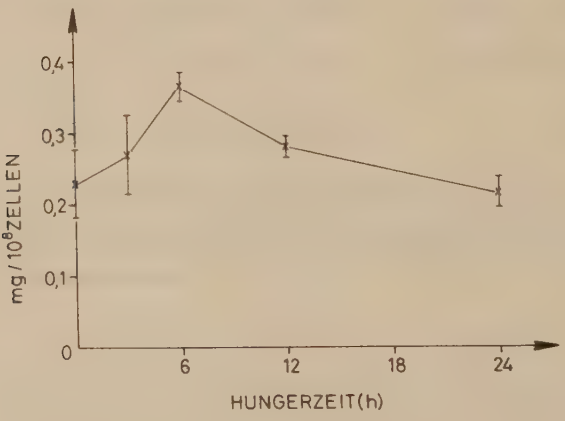


Abb. 13: Veränderungen des Gehalts löslicher Kohlenhydrate (Glykogen) während der Inkubation der Zellen im Hungermedium. Eingetragen sind die jeweiligen Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Glykogen wird als Menge der Glukoseäquivalente mit der Anthronmethode bestimmt (siehe 2.2.2.7.). Die vorausgehende schonende Extraktion der Zellen bedingt, daß nur lösliche Kohlenhydrate erfaßt werden. Schwerlösliche Polysaccharide, z.B. aus der Zellwand, werden nicht erfaßt.

Die Veränderungen des Gehalts an löslichen Kohlenhydraten in den Zellen sind in Abb. 13 dargestellt. Der Gehalt von 10^8 Zellen beträgt zu Beginn der Inkubation 0,23 mg ($s = \pm 0{,}05$ mg) und steigt innerhalb der nächsten 6 h auf 0,37 ($s = \pm 0{,}02$ mg) an, um danach wieder auf 0,22 mg ($s = \pm 0{,}02$ mg) abzufallen. Die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen wurden aus Doppelbestimmungen zweier unabhängiger Versuchsreihen ermittelt.

Die Verlaufskurve des Gehalts an löslichen Kohlenhydraten (Glykogen) deutet für den Zeitraum bis zu 6 h seit Beginn des Hungers durch eine positive Bilanz auf eine Neusynthese hin. Anschließend nimmt der Gehalt wieder ab. Eine Aussage, ob weiterhin eine Neusynthese löslicher Kohlenhydrate erfolgt, ist nicht mehr möglich. Ebensowenig lassen die Ergebnisse der Bestimmungen von Gesamt-RNA und des Proteins einen Schluß darüber zu, ob während des untersuchten Zeitraums nur ein Abbau oder auch gleichzeitig eine Neusynthese dieser Stoffe stattfindet. Sobald die Neusynthese quantitativ geringer ist als der Abbau, ist in der Bilanz nur noch eine Abnahme des

Gesamtgehaltes faßbar. Deshalb wird im folgenden versucht, durch den Einsatz von radioaktiv markierten Praekursoren das Nebeneinander von Abbau und Neusynthese zu analysieren.

3.6. Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen

3.6.1. Proteinstoffwechsel

3.6.1.1. Voraussetzungen für die selektive Markierung von Zellinhaltsstoffen in D. discoideum mit (1-^{14}C)-Leucin

Da Amöben von D. d i s c o i d e u m mit E. c o l i B/2 in einer Zweiorganismenkultur angezüchtet werden, kann man eine bakterielle Kontamination auch durch wiederholtes Waschen und Abzentrifugieren der Amöben bei geringen Beschleunigungswerten (650 x g) und kurzen Zentrifugationszeiten (5 min) nicht ausschließen.
Eine Bestimmung der Lebendkeimzahl von Bakterien im Hungermedium ergibt, daß neben etwa $1x10^7$ Zellen von D. d i s c o i d e u m / ml etwa $2x10^3$ vermehrungsfähige Bakterien/ml Suspension vorhanden sind. Trotz der sehr geringen Anzahl von Bakterien neben den Zellen von D. d i s c o i d e u m können die Bakterien wegen ihres intensiveren Stoffwechsels die Ergebnisse von Stoffwechseluntersuchungen verfälschen. Dagegen müssen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Um die Proteinsynthese in Prokaryonten zu blockieren, bietet sich das Antibiotikum Streptomycinsulfat an. Nach TANAKA et al. beruht

die Wirkung des Streptomycin darauf, daß es an ein Protein der 30S Untereinheit prokaryoter Ribosomen bindet (43).

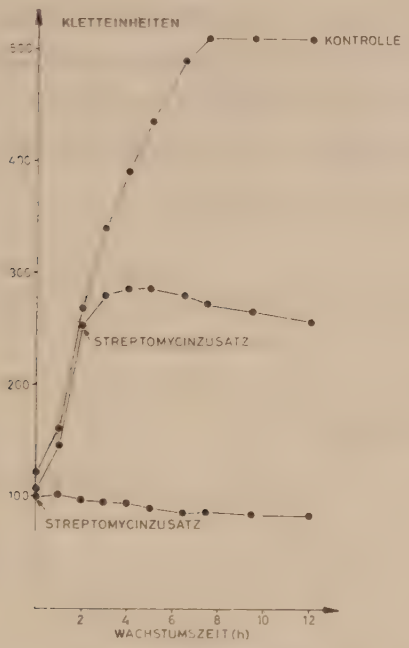


Abb. 14: Hemmung des Wachstums von E. c o l i B/2 in Standard-I-Nährbouillon (MERCK) bei 37°C durch Zusatz von Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml).

Dadurch wird die Proteinsynthese blockiert. Die Wirksamkeit des Antibiotikums Streptomycin als Wachstumshemmer für E. c o l i B/2 soll zunächst unter Wachstumsbedingungen untersucht werden, die für diesen Stamm optimal sind. Dazu werden 25,0 ml Standard-I-Nährbouillon (siehe 2.1.2.2.2.) mit Zellen von E. c o l i B/2 (Konzentration 2×10^8 Zellen/ml) beimpft. Setzt man das Streptomycinsulfat (Konzentration 0,5 mg/ml) gleich

nach Beimpfen der Kultur zu, so wird die Vermehrung der Bakterien sofort und vollständig gehemmt. Setzt man das Streptomycinsulfat zwei Stunden später zu, - die Bakterien befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der logarithmischen Wachstumsphase -, so tritt ebenfalls, wenn auch etwas verzögert, eine totale Wachstumshemmung ein (siehe Abb. 14). Streptomycinsulfat ist also ein geeignetes Antibiotikum zur Hemmung der Vermehrung von E. c o l i B/2.

Im Hungenmedium sind die Bedingungen für die Vermehrung von E. c o l i B/2 viel schlechter:

1. Die Ausgangszelldichte ist bedeutend kleiner
2. Es herrscht Nahrungsmangel
3. Die Bakterien sind nur noch teilweise lebensfähig, da sie tiefgefroren gelagert wurden
4. Die Temperatur von 23°C ist nicht optimal für das Bakterienwachstum.

Nachdem also feststeht, daß Streptomycinsulfat die Vermehrung der Bakterien selbst unter optimalen Bedingungen hemmt, wird nun untersucht, wie wirkungsvoll es den Einbau von (1-^{14}C)-Leucin in Proteine von E. c o l i im Hungermedium verhindern kann.

Im folgenden Versuch werden keine optimalen Bedingungen für E. c o l i gewählt. Die bei -20°C gelagerten Bakterien werden aufgetaut und in 10,0 ml 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 zu einer Zelldichte von 1x10^{10} Zellen/ml suspendiert. Anschließend werden sie bei 22°C geschüttelt. Streptomycinsulfat wird in einer Konzentration

von 0,5 mg/ml hinzugefügt. Nach 30 min wird (1-^{14}C)-Leucin in einer Konzentration von 0,2 µCi/ml zugesetzt. Der Gesamtansatz beträgt 10,0 ml. Nach 0, 2, 6 und 8 h werden Proben entnommen und der kalten TCA-Fällung (siehe 2.2.6.2.) unterworfen. In Abb. 15 ist der Einbauverlauf mit (Kurve I) und ohne (Kurve II) Streptomycinsulfat gezeigt. Die Einbauhemmung ist deutlich erkennbar.

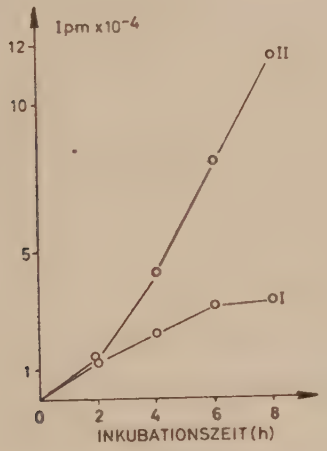


Abb. 15: Einbau von (1-^{14}C)-Leucin (0,2 µCi/ml)in E. c o l i B/2 bei 22°C in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0. Die Werte (Mittelwerte aus zwei Bestimmungen) zeigen den Gesamteinbau in Zellen einer Kultur von 10,0 ml ($1x10^{10}$ Bakterien/ml).
Kurve I: Zusatz von Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml)
Kurve II: ohne Antibiotikum.

Ohne Streptomycinsulfat werden innerhalb von 8 h 2,9 % der angebotenen Radioaktivität in das mit kalter TCA fällbare Material der Bakterien eingebaut. Der Streptomycinzusatz vermindert den Einbau unter sonst gleichen

Bedingungen auf 0,8 % bezogen auf die angebotene Radioaktivität. Vergleicht man den Einbau mit und ohne Streptomycinsulfat, so stellt man fest, daß der Zusatz von Streptomycinsulfat den Einbau von (1-^{14}C)-Leucin unter den beschriebenen Bedingungen um etwa 73 % senkt.

Dieser Versuch zeigt, daß eine weitgehend selektive Markierung der Proteine der Amöben möglich ist, da in Gegenwart von Streptomycinsulfat nur geringe Mengen des radioaktiv markierten Leucin in die Bakterien eingebaut werden.

3.6.1.2. Einbau von (1-^{14}C)-Leucin in D. discoideum während der Vermehrungsphase und während der Inkubation der Amöben im Hungermedium

a) Einbau während der Vermehrungsphase

Das Wachstum der Amöben erfolgt in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 einer Zweiorganismenkultur mit E. c o l i B/2 (Bakterienzelldichte zu Beginn des Wachstums etwa $1x10^{10}$/ml). Das bakterielle Wachstum und der Einbau von (1-^{14}C)-Leucin in die Zellen von E. c o l i B/2 wird, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, durch den Zusatz von Streptomycinsulfat unterdrückt.

Zu Kulturen von 10,0 ml logarithmisch wachsenden Amöben wird Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) gegeben. 30 min darauf wird (1-^{14}C)-Leucin in einer Konzentration von 0,5 µCi/ml zugesetzt. Die ersten Proben werden sofort nach Zugabe der radioaktiv markierten Aminosäure

entnommen. Sie dienen der Kontrolle. Weitere Entnahmen erfolgen nach 2, 4 und 6 h. Gleichzeitig entnommene Proben werden sowohl der kalten wie der heißen TCA-Extraktion unterworfen (siehe 2.2.6.2.). Die Niederschläge werden über Membranfilter (1,2 µm Porenweite) abgesaugt und gewaschen. Die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wird bestimmt (siehe 2.2.6.4.). Der Verlauf des Einbaus wird in Abb. 16a gezeigt. Der höchste Leucineinbau wird in der Probe ermittelt, die nach 2 h entnommen wird. 14,9 % des angebotenen (1-^{14}C)-Leucin sind zu diesem Zeitpunkt in die Proteinfraktion eingebaut, d.h., die Radioaktivität bleibt nach heißer TCA-Extraktion im Niederschlag. Nach weiteren 4 h findet man noch 12,1 % der angebotenen Radioaktivität in dieser Fraktion.

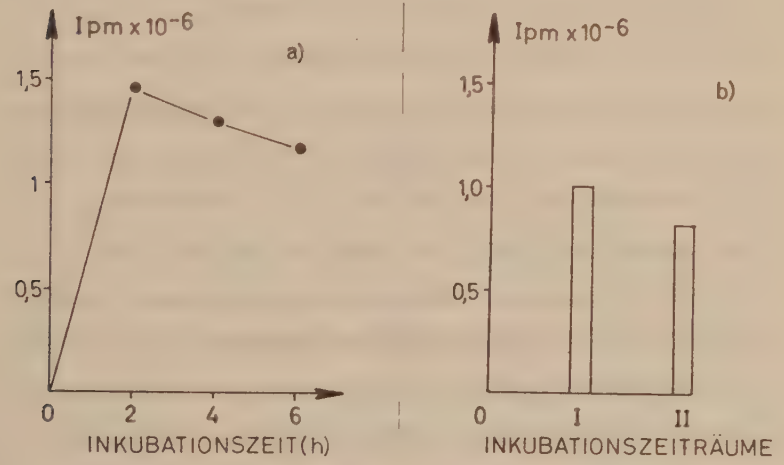


Abb. 16: Einbau von (1-^{14}C)-Leucin (0,5 µCi/ml) in D. d i s c o i d e u m (10,0 ml Kulturen): a) während des Wachstums, b) während der Inkubation im Hungermedium; Inkubationszeitraum I: von 0,5 - 6,5 h seit Beginn des Hungers, Inkubationszeitraum II: von 6 - 12 h seit Beginn des Hungers. Jeweils 30 min vor Zugabe des (1-^{14}C)-Leucin wird Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) zugesetzt. Eingezeichnet sind Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen.

b) Einbau von (1-^{14}C)-Leucin während der Inkubation der Zellen im Hungermedium

Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase werden die Amöben von D. d i s c o i d e u m abzentrifugiert, gewaschen und in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 suspendiert, so daß die Zelldichte etwa $1x10^7$ Zellen/ml Suspension beträgt. Es werden jeweils Ansätze von 10,0 ml verarbeitet. Wieder wird der Suspension sofort Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) zugesetzt. 30 min später wird (1-^{14}C)-Leucin hinzugefügt. Die Konzentration ist wiederum 0,5 µCi/ml Suspension. Die Amöben werden in diesen Ansätzen unter Hungerbedingungen 6 h bei 23°C im Schüttelbad inkubiert. Der Einbau wird nun in verschiedenen Zeiträumen ermittelt. Zum einen handelt es sich um den Zeitraum I von 0,5 bis 6,5 h nach Eintritt des Hungers, d.h., seit Abtrennen der Amöben von der Nahrungsquelle. Zum andern ist es der Inkubationszeitraum II von 6 bis 12 h nach Eintritt der Amöben in die Hungerphase.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wird die in die Zellen eingebaute Radioaktivität bestimmt. Hierzu werden die Zellen der heißen TCA-Extraktion unterworfen (siehe 2.2.6.2.). Die Radioaktivität wird anschließend wie unter 2.2.6.4. beschrieben bestimmt.

Der (1-^{14}C)-Leucin-Einbau in den untersuchten Inkubationszeiträumen ist in Abb. 16b dargestellt. Im Inkubationszeitraum I werden 10,4 % des angebotenen radioaktiv markierten Leucin in die Proteinfraktion eingebaut, im Inkubationszeitraum II 8,3 %. Die Zellen sind demnach

in der Lage, auch während der Inkubation im Hungermedium noch beträchtliche Mengen an Leucin aufzunehmen und einzubauen. Hieraus kann man auf ein intaktes Aufnahmesystem der Zellen für Leucin während der Inkubation im Hungermedium schließen. Außerdem zeigt das Ergebnis eine rege Proteinsynthese der Zellen in den untersuchten Zeiträumen.

In welchem Maße die Zellen die Radioaktivität aus dem angebotenen (1-^{14}C)-Leucin in Proteine oder andere Zellinhaltsstoffe ein- und diese anschließend wieder abbauen, soll der folgende Versuch zeigen.

3.6.1.3. Der Weg der aus (1-^{14}C)-Leucin stammenden Radioaktivität in den verschiedenen Zellinhaltsstoffen während des Hungers

Die Amöben werden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert und gewaschen. Sie werden in parallelen Ansätzen von je 8,0 ml 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 zu einer Zelldichte von etwa $0{,}6 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert, d.h., jeder Ansatz enthält etwa $0{,}5 \times 10^8$ Zellen. Jeder Ansatz wird 30 min mit Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) vorinkubiert. Anschließend werden je Ansatz 0,5 µCi (1-^{14}C)-Leucin zugesetzt. Diese Kulturen werden bei 23°C geschüttelt.

Nach einer Gesamtzeit von 6, 18, 24 und 42 h werden Ansätze mit radioaktiv markierten Zellen abzentrifugiert und gewaschen. Die Zellen je eines Ansatzes werden einer

modifizierten Zellfraktionierung nach SCHMIDT und THANNHAUSER (siehe 2.2.3.1.) unterworfen. Die Radioaktivität, die sich in den einzelnen Fraktionen befindet, wird bestimmt. In Abb. 17 ist dargestellt, wie sich die radioaktive Markierung in den einzelnen Fraktionen während der Zeit der Inkubation verändert. Kurve I zeigt den Verlauf der Markierung der Proteine, die am Ende des Extraktionsganges als Präzipitat zurückbleiben.

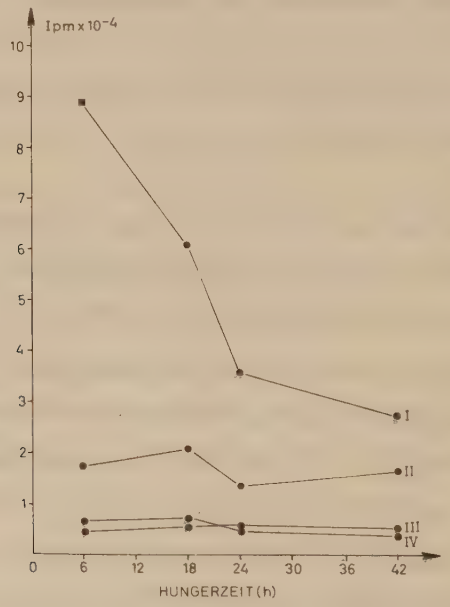


Abb. 17: Der Weg der Verteilung der radioaktiven Markierung aus (1-^{14}C)-Leucin während des Hungers von *D. discoideum* im flüssigen Medium. Dargestellt ist die Radioaktivität in der Proteinfraktion (I), in der Fraktion der äthanollöslichen Zellinhaltsstoffe (II), in der Fraktion der niedermolekularen Metabolite (III) und in der Fraktion der Polynukleotide (IV). Die Punkte stellen Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen dar.

Die Abnahme der radioaktiven Markierung in dieser Fraktion ist sehr deutlich. Im Zeitraum von 6 h bis 24 h nach Hungerbeginn nimmt die in dieser Fraktion befindliche Radioaktivität um 59 % ab, das heißt, mehr als die Hälfte des Proteins, das nach 6 h radioaktiv markiert war, ist in diesem Zeitraum abgebaut worden.

Die Kurve II (Abb. 17) zeigt die radioaktive Markierung in der Fraktion der äthanollöslichen Substanzen. Diese Fraktion enthält Lipide und äthanollösliche Proteine. In dieser Fraktion sind keine wesentlichen Veränderungen der Gesamtradioaktivität festzustellen. Extrahiert man die Lipide mit Äther, so bleiben die äthanollöslichen Proteine zurück. 6 h nach Inkubationsbeginn ist das Verhältnis der Markierung der Lipide zu dem der äthanollöslichen Proteine etwa 1:2. Dieses Verhältnis verschiebt sich leicht zugunsten der äthanollöslichen Proteine. Nach 42 h Inkubationszeit findet man ein Verhältnis der radioaktiven Markierung der Lipide zu dem der äthanollöslichen Proteine von 1:3.

Die Markierung der niedermolekularen Metabolite (Kurve III in Abb. 17) und die der Polynukleotide (Kurve IV in Abb. 17) ist sehr gering. Es zeigen sich in beiden Fällen keine auffälligen Veränderungen.

Dieser Versuch zeigt, daß durch (1-^{14}C)-Leucin im wesentlichen eine Markierung der Proteine erfolgt. Die nur unwesentlichen Veränderungen der Radioaktivität in den nicht-Proteinfraktionen zeigen, daß das Leucin aus den

abgebauten Proteinen praktisch nicht in die anderen Fraktionen eingeht.

Insgesamt wird deutlich, daß während der Hungerzeit in flüssigem Medium ein intensiver Stoffwechsel stattfindet. Am auffälligsten sind hierbei die Veränderungen der radioaktiven Markierung in der Proteinfraktion. Durch den intensiven Abbau der Proteine während des Hungers ist die Gesamtbilanz der Radioaktivität durch die Bildung von $^{14}CO_2$ negativ.

3.6.2. RNA-Stoffwechsel

3.6.2.1. Voraussetzungen für die selektive radioaktive Markierung von Zellinhaltsstoffen in D. discoideum mit (5,6-^{3}H)-Uracil und (2-^{14}C)-Uracil

Diese Untersuchungen sind aus den schon unter 3.6.1.1. beschriebenen Gründen notwendig.

Rifampicin hemmt die DNA-abhängige RNA-Polymerase in Prokaryonten, d.h., die RNA-Biosynthese wird blockiert. Etwa 20 µg Rifampicin/ml hemmen nach LANCINI et al. augenblicklich den Einbau von (2-^{14}C)-Uracil in wachsende Zellen von E. c o l i K/12 (44). Die RNA-Synthese in Eukaryonten dagegen wird nicht wesentlich beeinflußt. YANG et al. berichten, daß durch Rifamycin keine merkliche Wirkung auf den Nukleotid-Einbau in RNA von isolierten Mitochondrien von S a c c h a r o m y c e s

c a r l s b e r g e n s i s festzustellen sei (45). Auch WINTERSBERGER et al. sagen aus, daß selbst 50 µg Rifampicin keine Hemmung der RNA-Polymerase in Hefe zur Folge haben. Das gleiche berichten sie von der Wirkung dieses Antibiotikums auf die RNA-Synthese in isolierten, hochgereinigten Hefe-Mitochondrien. Sie führen dies darauf zurück, daß Rifampicin die Membran der Hefe-Mitochondrien nicht passieren kann (46). Dagegen stellen WEHRLI et al. durch 20 µg Rifamycin SV/ml eine etwa 5 %ige Hemmung der RNA-Polymerase in Rattenleber fest (47).

Die zitierten Ergebnisse beweisen eine ausgeprägte Wirkung von Rifampicin auf den Stoffwechsel von Prokaryonten. Andererseits wird deutlich, daß der Stoffwechsel von Eukaryonten im wesentlichen unbeeinflußt bleibt.

Sollte Rifampicin, was zu erwarten ist, den Einbau von (5,6-^{3}H)-Uracil in die RNA auch von E. c o l i B/2 unterdrücken, so wäre damit ein Weg gefunden, die RNA in D. d i s c o i d e u m selektiv zu markieren.

Deshalb wird nun der Einbau von (5,6-^{3}H)-Uracil in E. c o l i B/2 unter dem Einfluß von Streptomycinsulfat und Rifampicin untersucht. Dazu werden tiefgefrorene E. c o l i B/2 - Zellen in 20,0 ml 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 zu einer Zelldichte von etwa $1x10^{10}$ Zellen/ml Puffer suspendiert. Die Ansätze werden bei 22°C geschüttelt. Dies entspricht etwa den späteren Kulturbedingungen von D. d i s c o i d e u m , wenngleich die Bakterienzahl/ml zum Zeitpunkt der Einbauversuche

mit radioaktiv markiertem Uracil in D. d i s c o i - d e u m sehr viel kleiner sein wird. Die Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

Ansatz	Antibiotika	Konzentration
1	-	-
2	Streptomycin-sulfat	0,5 mg/ml
3	Streptomycin-sulfat	0,5 mg/ml
	+ Rifampicin	0,02 mg/ml

Nach 30 min der Vorinkubation mit den entsprechenden Antibiotika werden 0,2 µCi (0,01 µCi/ml) (5,6-^{3}H)-Uracil hinzugegeben. Die erste Probe wird jeweils sofort nach Zusatz des markierten Uracil entnommen und dient als Kontrolle. Der Einbau wird über 7,5 h verfolgt. Die Zellen werden, wie unter 2.2.6.2. beschrieben, der kalten TCA-Fällung unterworfen. Die Radioaktivität, die sich im Präzipitat befindet, wird, wie unter 2.2.6.4. beschrieben, bestimmt.

Abb. 18 zeigt den Einbau von markiertem Uracil unter den verschiedenen Bedingungen. Kurve I zeigt den Einbau von Uracil ohne den Einsatz von Antibiotika. Während des ganzen Untersuchungszeitraums findet man eine deutliche Zunahme des eingebauten Uracil. Nach 7,5 h sind 2,12 % des angebotenen radioaktiv markierten Uracil in die Bakterien eingebaut. 0,5 mg Streptomycin-

sulfat/ml Suspension kann den Einbau von (5,6-^{3}H)-Uracil nur in unbedeutendem Maße hemmen. Die Einbaukurve (Abb.18, Kurve II) verläuft zwar etwas flacher als die Kontrollkurve, zeigt aber im wesentlichen die gleiche Tendenz. Nach 7,5 h sind in diesem Fall etwa 1,6 % der angebotenen Radioaktivität in die Zellen eingebaut. Das entspricht gegenüber der Kontrolle einer Einbauhemmung von etwa 25 %.

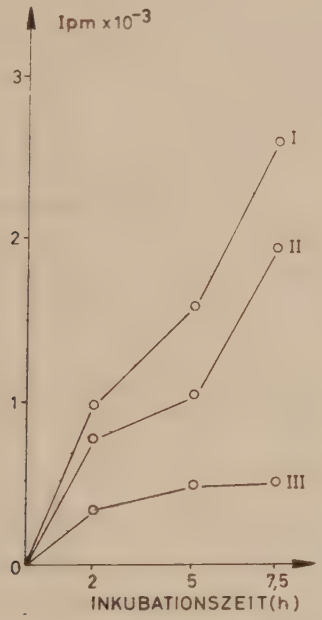


Abb. 18: Einbau von (5,6-^{3}H)-Uracil (0,01 µCi/ml) in E. c o l i B/2 bei 22°C in 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0. Die Werte (Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen) zeigen den Gesamteinbau in eine Kultur von 20,0 ml mit einer Zelldichte von etwa $1x10^{8}$ Bakterien/ml. Kurve I: ohne Antibiotika; Kurve II: mit 0,5 mg Streptomycinsulfat/ml; Kurve III: mit 0,5 mg Streptomycinsulfat/ml und 0,02 mg Rifampicin/ml.

Völlig anders dagegen verläuft die Kurve III. Sie zeigt den Verlauf des Einbaus von Uracil in das mit kalter TCA fällbare Material unter dem gemeinsamen Einfluß von Streptomycinsulfat und Rifampicin in den angegebenen Konzentrationen. Diese Kurve zeigt schon sehr bald einen parallelen Verlauf zur Abszisse, d.h., der Einbau kommt zum Erliegen. Insgesamt findet man nach 7,5 h der Inkubation 0,48 % der angebotenen Radioaktivität in dem mit kalter TCA fällbaren Material. Verglichen mit der Kontrolle bedeutet dies für den Zeitraum von 7,5 h eine Hemmung des Einbaus um fast 80 %.

Die Kombination der beiden Antibiotika gewährleistet den obigen Ergebnissen zufolge eine gute Einbauhemmung von (5,6-^{3}H)-Uracil in E. c o l i B/2. Wie der Einbau von radioaktiv markiertem Uracil in Gegenwart der Antibiotika in Zellen von D. d i s c o i d e u m verläuft, sollen die folgenden Untersuchungen zeigen.

7.6.2.2. Einbau von (2-^{14}C)-Uracil in D. discoideum während der Vermehrungsphase der Amöben und im Hungermedium

a) Während der Vermehrungsphase

Einer Kultur (10,0 ml) von D. d i s c o i d e u m, die sich in einer logarithmischen Wachstumsphase auf E. c o l i B/2 befindet, werden 0,5 mg Streptomycinsulfat/ml und 0,02 mg Rifampicin/ml zugesetzt. Nach 30 min wird (2-^{14}C)-Uracil (spezifische Radioaktivität 59 mCi/mmol) in einer Endkonzentration von 0,5 µCi/ml zugefügt. Die

ersten Proben werden sofort nach Zusatz des radioaktiv markierten Uracil entnommen, weitere Proben in zweistündigem Abstand. Von parallel entnommenen Proben werden je zwei der kalten und je zwei der heißen TCA-Extraktion unterworfen (siehe 2.2.6.2.). Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgt wie unter 2.2.6.4. beschrieben.

Der höchste Uracileinbau wird in der Probe ermittelt, die 2 h nach dem Zusatz des radioaktiv markierten Uracil entnommen wird (siehe Abb. 19 a). Zu diesem Zeitpunkt sind 9,4 % der durch (2-^{14}C)-Uracil angebotenen Radioaktivität durch kalte TCA fällbar. Während der nächsten 4 h nimmt die durch kalte TCA fällbare Radioaktivität geringfügig auf 8,0 % vom Gesamtangebot ab.

Behandelt man die Proben jedoch mit heißer TCA, so findet man im Niederschlag nur 0,5 % der angebotenen Radioaktivität wieder. Daraus ist zu schließen, daß der überwiegende Anteil der mit (2-^{14}C)-Uracil angebotenen Radioaktivität in Polynukleotide eingebaut wurde, die bekanntlich einer Hydrolyse mit heißer TCA nicht standhalten.

b) Einbau von (2-^{14}C)-Uracil in Zellen im Hungermedium

Amöben werden im Hungermedium in einer Zelldichte von etwa 1×10^7 Zellen/ml suspendiert. Der Suspension werden sofort 0,5 mg Streptomycinsulfat/ml zugesetzt. Die Ansätze enthalten 10,0 ml Zellsuspension. Rifampicin (0,02 mg/ml) wird jeweils 30 min vor Zusatz des radioaktiv markierten Uracil hinzugegeben. Die Konzentration des (2-^{14}C)-Uracil ist 0,5 µCi/ml Suspension. Die Amöben werden in diesen

Ansätzen unter Hungerbedingungen 6 h bei 23°C im Schüttelbad inkubiert.

Der Inkubationszeitraum I umfaßt die Zeit von 30 min bis 6,5 h, der Inkubationszeitraum II die Zeit von 6 bis 12 h seit Beginn der Inkubation der Zellen im Hungermedium.

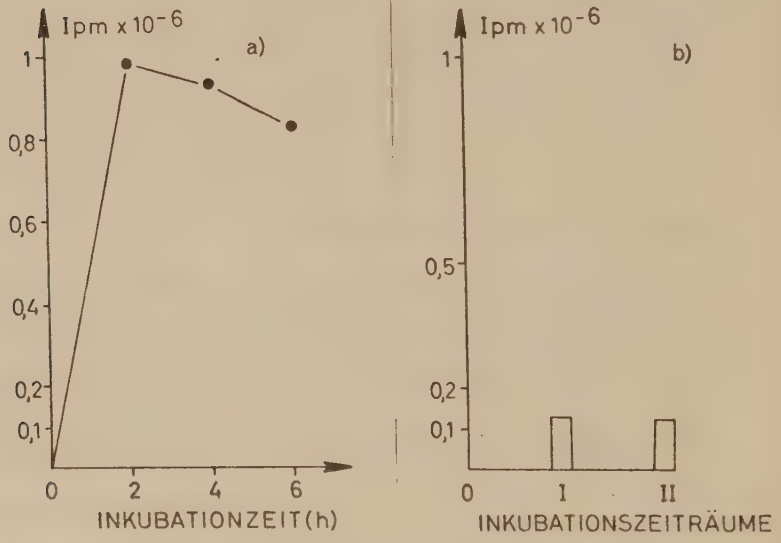


Abb. 19: Einbau von (2-^{14}C)-Uracil (0,5 µCi/ml) in D. d i s c o i d e u m (10,0 ml Kulturen): a) während des Wachstums, b) während der Inkubation im Hungermedium; Inkubationszeitraum I: von 0,5 - 6,5 h seit Beginn des Hungers, Inkubationszeitraum II: von 6 - 12 h seit Beginn des Hungers. Jeweils 30 min vor Zusatz des (2-^{14}C)-Uracil werden Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) und Rifampicin (0,02 mg/ml) zugesetzt. Eingezeichnet sind Mittelwerte aus je zwei Bestimmungen.

Nach der Inkubationszeit werden die Zellen der kalten TCA-Extraktion unterworfen. Das Ergebnis ist in Abb. 19b

dargestellt. Während des Inkubationszeitraumes I werden 1,2 %, im Inkubationszeitraum II 1,1 % der angebotenen Radioaktivität nach der kalten TCA-Extraktion im Niederschlag gefunden. Der Hydrolyse mit heißer TCA hält das Material nicht stand, das läßt den Schluß zu, daß die Radioaktivität in Polynukleotide eingebaut wurde. Vergleicht man Abb. 19a und Abb. 19b, so stellt man fest, daß während der Inkubation der Zellen im Hungermedium sehr viel weniger Uracil eingebaut wird. Während der 6-stündigen Inkubation der Amöben in der Wachstumsphase wird etwa sechsmal mehr (2-^{14}C)-Uracil eingebaut als während des Inkubationszeitraumes I.

Die sich jetzt anschließenden Versuche sollen zeigen, ob die gemessene Radioaktivität tatsächlich in die RNA von D. d i s c o i d e u m eingebaut wurde.

3.6.2.3. Untersuchungen des Einbaus von (5,6-^{3}H)-Uracil durch Bestimmung der radioaktiven Markierung in extrahierter und gereinigter RNA

Diese Untersuchungen werden mit Tritium-markiertem Uracil einer hohen spezifischen Radioaktivität (44 Ci/mmol) durchgeführt.

Im ersten Fall befinden sich die Amöben in der logarithmischen Wachstumsphase. Den Kulturen wird entweder nur Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) oder ein Gemisch aus Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) und Rifampicin (0,02 mg/ml) zugesetzt. Nach der Vorinkubationszeit von 30 min werden

jedem Ansatz von 25,0 ml Zellsuspension 100 µCi (5,6-^{3}H)-Uracil der oben genannten spezifischen Radioaktivität zugegeben. Die Inkubationszeit mit dem radioaktiv markierten Uracil beträgt 6 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen jedes Ansatzes (ein Ansatz ergibt $2x10^8$ Amöben) abzentrifugiert und gewaschen. Anschliessend wird die RNA extrahiert und gereinigt (s. 2.2.3.2.). Zunächst wird die Gesamtmenge der extrahierten RNA, wie unter 2.2.2.8. beschrieben, bestimmt, anschließend die darin enthaltene Radioaktivität ermittelt.

In gleicher Weise wie oben beschrieben werden auch Amöbensuspensionen ($2x10^8$ Amöben/Ansatz von 25,0 ml) im Hungermedium behandelt.

Aus der gleichen Menge Zellen, ob sie nur mit Streptomycinsulfat oder mit dem Gemisch aus Streptomycinsulfat und Rifampicin behandelt wurden, wird etwa die gleiche Menge RNA extrahiert. Aus $2x10^8$ Amöben werden am Ende des logarithmischen Wachstums 5,1 mg bzw. 4,9 mg RNA extrahiert. Die Zellen, die 6 h im Hungermedium inkubiert wurden, zeigen einen RNA-Gehalt von 3,9 bzw. 3,6 mg je $2x10^8$ Amöben. Der Gehalt liegt hier, bedingt durch den Abbau der RNA während des Hungers, tiefer als in gerade ausgewachsenen Amöben (siehe Abb. 20).

Unterschiede entdeckt man jedoch, wenn man die Radioaktivität pro mg RNA in der aus den verschiedenen Ansätzen extrahierten RNA betrachtet. Auffällig niedrig ist dieser Quotient mit $0,18x10^6$ Ipm/mg RNA (siehe Abb. 20), in den

Zellen, die im Hungermedium mit dem Gemisch aus Rifampicin und Streptomycinsulfat behandelt wurden. Etwa siebenmal größer ist dieser Quotient in Zellen aus einer wachsenden Kultur, der das Gemisch der beiden Antibiotika zugesetzt wurde. Der Grund des unterschiedlichen Einbaus von Radioaktivität pro mg RNA ist darin zu sehen, daß es sich bei den untersuchten Zellen einmal um hungernde und einmal um wachsende Zellen handelt.

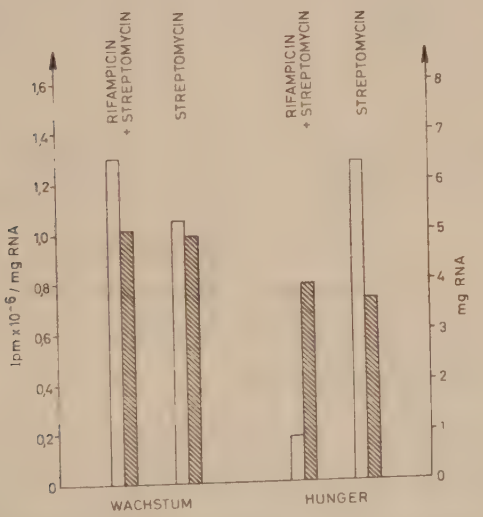


Abb. 20: Einbau von (5,6-^{3}H)-Uracil (4 µCi/ml) in D. d i s c o i d e u m (25,0 ml Kulturen) während des Wachstums und des Hungers in flüssigem Medium. Dargestellt sind die aus $2x10^{8}$ Zellen extrahierte RNA (schraffierte Säulen) und die in 1 mg dieser RNA enthaltene Radioaktivität aus (5,6-^{3}H)-Uracil (weiße Säule) unter dem Einfluß der angegebenen Antibiotika.

Werden die Zellen vor der radioaktiven Markierung nur mit Streptomycinsulfat behandelt, so ist der Quotient Radioaktivität/mg RNA gleichermaßen hoch, ob die Markierung nun während des Wachstums der Amöben oder während der Inkubation der Amöben im Hungermedium erfolgt (Abb. 20). Aller Wahrscheinlichkeit nach wurde in diesen Fällen radioaktiv markiertes Uracil in die kontaminierenden Bakterien eingebaut. Eine Entscheidung hierüber ist durch die Auftrennung der RNA bei der Dichtegradientenzentrifugation möglich. Die entsprechenden RNA-Arten von Eukaryonten und Prokaryonten unterscheiden sich in ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit bei der Zentrifugation im Dichtegradienten.

Die Dichtegradientenzentrifugation macht deutlich (siehe Abb. 21d), daß die hohe radioaktive Markierung von RNA in der Kultur, die während des Hungers nur mit Streptomycinsulfat inkubiert wurde, auf die Markierung der leichteren RNA der Bakterien (Fraktionen 7 - 12 und 18 - 24) zurückzuführen ist.

Durch die Zugabe von Rifampicin jedoch läßt sich die radioaktive Markierung der Prokaryonten-RNA, wie Abb. 21c zeigt, weitgehend unterdrücken. Geringe Mengen radioaktiv markierten Materials findet man nur im Bereich der niedermolekularen RNA (Fraktionen 37 - 43). Als wesentliches Ergebnis zeigt sich, daß sowohl in der 28 S RNA als auch in der 18 S RNA der Zellen von D. d i s c o i d e u m nach Rifampicinzusatz während der Inkubation im Hungermedium keine wesentliche Radioaktvität festzustellen ist.

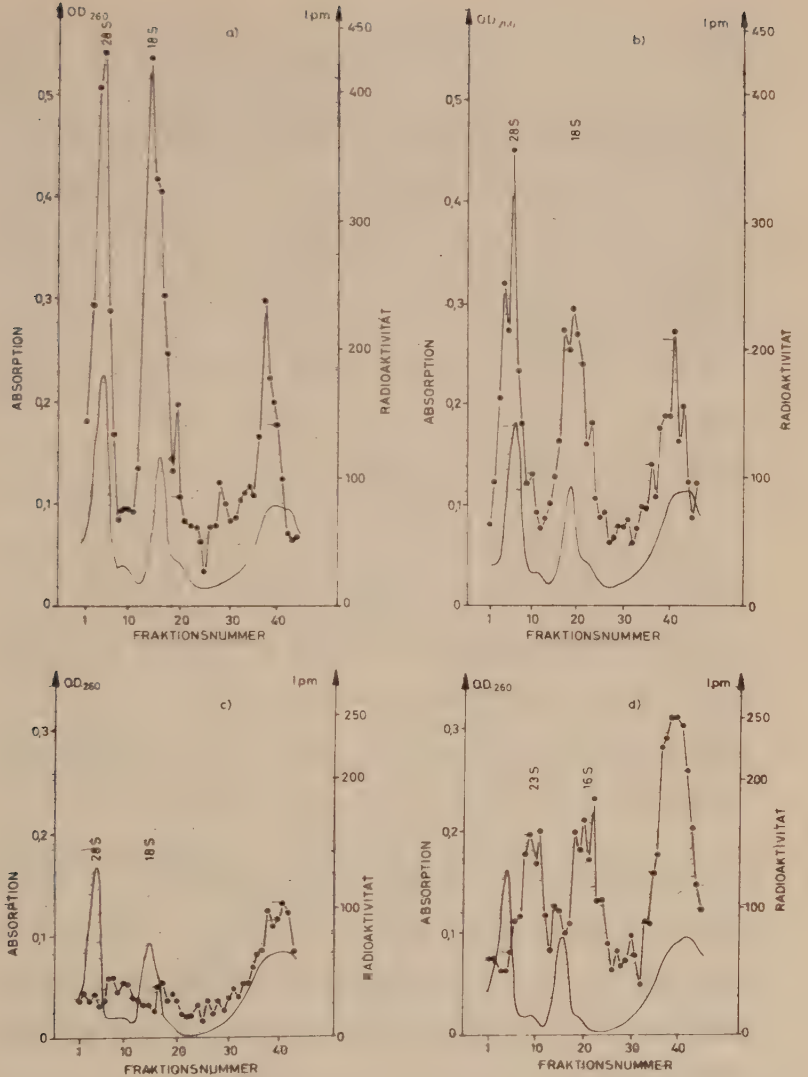


Abb. 21: Dichtegradientenzentrifugation von RNA, die unter verschiedenen Bedingungen mit (5,6-^{3}H)-Uracil markiert wurde. a) und b) Markierung während des Wachstums der Amöben auf E. c o l i B/2, a) nach Zusatz von Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) und Rifampicin (0,02 mg/ml), b) nach Zusatz von Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml); c) und d) Markierung während der Inkubation der Amöben im Hungermedium, c) Zusatz wie a), d) Zusatz wie bei b). Absorption bei λ = 260 nm ——, Radioaktivität •——•. Die Dichte der Gradienten nimmt von recht nach links zu.

Abb. 21b zeigt die radioaktive Markierung der RNA in Amöben während des Wachstums in einer Kultur, der nur Streptomycinsulfat zugesetzt ist. Hier findet man die Hauptmenge der radioaktiven Markierung in der RNA der Amöben und nur geringe Mengen in der leichteren bakteriellen RNA ("Nebenpeak" = Fraktionen 9 - 11 und 22 - 26). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Bakterien und mit ihnen ihre markierte RNA in dieser Phase von den sich vermehrenden Amöben phagozytiert und verdaut werden.

Die beste radioaktive Markierung der RNA von D. d i s c o i d e u m ist, wie Abb. 21a zeigt, während des Wachstums der Amöben möglich, wenn die Markierung der bakteriellen RNA durch den Einsatz des Antibiotikagemisches aus Streptomycinsulfat und Rifampicin in den angegebenen Konzentrationen unterbunden wird.

Diese Versuchsreihe zeigt, daß es unter den beschriebenen Bedingungen nicht möglich ist, die RNA von D. d i s c o i d e u m während der Inkubation im Hungermedium hinreichend mit (5,6-^{3}H)-Uracil zu markieren. Die Markierung der RNA von Amöben mit (5,6-^{3}H)-Uracil während des Wachstums ist nach Verhinderung der Markierung der bakteriellen RNA durch das Antibiotikagemisch sehr gut möglich.

3.6.2.4. Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat in D. discoideum während des Hungers

a) Abhängigkeit vom Orthophosphatgehalt des Mediums

Logarithmisch wachsende Amöben werden geerntet und dreimal nacheinander mit 7,5 mM MES-Puffer pH 6,0 gewaschen (MES = Morpholinoäthansulfonsäure). Danach werden die Zellen in Puffern bestimmter MES- und Phosphatkonzentration zu einer Zelldichte von ungefähr 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert.

Zur Herstellung der Puffergemische dienen als Ausgangslösungen ein Phosphatpuffer (M/60 = 0,017 M; pH 6,0) und ein MES-Puffer (7,5 mM; pH 6,0). 1 Teil Phosphatpuffer wird mit 9 Teilen MES-Puffer gemischt, 1 Teil des sich ergebenden Puffers wieder mit 9 Teilen MES-Puffer und so fort.

Danach ergeben sich für die eingesetzten Puffer folgende rechnerisch ermittelte Konzentrationen an Phosphat und MES:

Puffer	Phosphatkonzentration (M)	MES-Konzentration (mM)
1	$M/60 = 1{,}7 \times 10^{-2}$	-
2	$M/60 \times 10^{-1} = 1{,}7 \times 10^{-3}$	6,75
3	$M/60 \times 10^{-2} = 1{,}7 \times 10^{-4}$	7,425
4	$M/60 \times 10^{-3} = 1{,}7 \times 10^{-5}$	7,4925
5	$M/60 \times 10^{-4} = 1{,}7 \times 10^{-6}$	7,49925

Die Phosphatkonzentration verringert sich als sukzessiv um den Faktor 10, während sich die MES-Konzentration von Puffer 2 bis 5 approximativ dem Wert 7,5 mM nähert.

Die Gesamtveränderung der MES-Konzentration von Puffer 2 bis 5 fällt nicht ins Gewicht. Der pH-Wert bleibt bei 6,0 konstant. Von hier sollte also kein Einfluß auf den Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat zu erwarten sein. Der für diese Versuchsreihe wesentliche Unterschied ist der unterschiedliche Phosphatgehalt. Die Veränderungen, die die eingestellten Phosphatpuffer durch die später hinzugefügte radioaktive Phosphatlösung erfahren, können wegen ihrer Geringfügigkeit außer acht gelassen werden.

Jeweils $5x10^7$ Amöben werden in 5,0 ml des entsprechenden Puffergemisches suspendiert. Nach einer Vorinkubation von 30 min Dauer mit Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) und Rifampicin (0,02 mg/ml) werden jedem Ansatz etwa 1,1 µCi (^{32}P)-Orthophosphat zugesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 2 h. Proben von je 0,5 ml werden der kalten TCA-Fällung unterworfen (2.2.6.3.). Die Radioaktivität in dem gefällten Zellmaterial wird bestimmt.

Abb. 22 zeigt den Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat in das mit kalter TCA fällbare Material in Abhängigkeit von der Konzentration des externen Phosphats. Für den untersuchten Bereich gilt, daß der (^{32}P)-Orthophosphat-Einbau um so höher ist, je geringer die Konzentration an externem Phosphat ist. Beträgt die externe Phosphatkonzentration $1,7x10^{-2}$ M, so werden etwa 0,06 % des (^{32}P)-Orthophosphat eingebaut. Bei einer Erniedrigung der externen Phosphatkonzentration auf $1,7x10^{-6}$ M werden dagegen ungefähr 4,7 % des angebotenen (^{32}P)-Orthophosphat eingebaut.

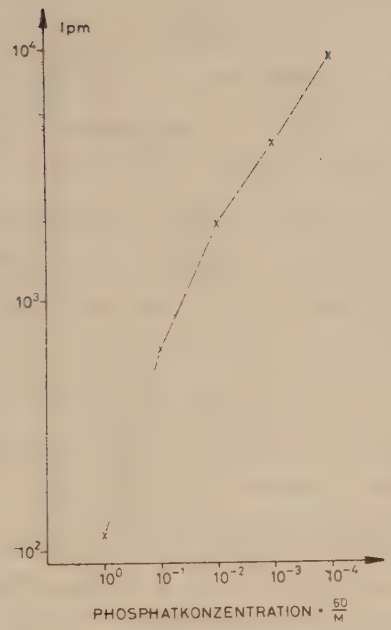


Abb. 22: Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat (0,22 µCi/ml) in D. d i s c o i d e u m in Medien unterschiedlicher Phosphatkonzentrationen. Die Werte (Mittelwerte je zweier Bestimmungen) zeigen den Einbau bei 23°C in etwa $5x10^6$ Zellen aus 0,5 ml Medium nach einer Inkubationszeit von 2 h (Einzelheiten siehe Text!).

Die folgenden Einbauversuche mit (^{32}P)-Orthophosphat werden, um einen gut meßbaren Einbau zu erzielen, bei einer Phosphatkonzentration von $1,7x10^{-6}$ M durchgeführt.

b) Markierung zu verschiedenen Zeiten des Hungers

Logarithmisch wachsende Amöben werden geerntet und mit 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen. In demselben Puffer werden die Zellen resuspendiert. Jeweils vor der

Inkubation der Zellen mit Streptomycinsulfat (0,5 mg/ml) und Rifampicin (0,02 mg/ml) wird das Hungermedium gewechselt. Nach Waschen mit MES-Puffer (7,5 mM, pH 6,0) werden die Zellen in MES-Puffer (7,5 mM, pH 6,0), der $1{,}7 \times 10^{-6}$ M Phosphat enthält, resuspendiert. Jeder Ansatz von 10,0 ml enthält etwa $1{,}5 \times 10^{8}$ Zellen. 30 min nach Zusatz der Antibiotika werden jedem Ansatz etwa 0,9 µCi (^{32}P)-Orthophosphat zugesetzt. Die Inkubationszeit mit (^{32}P)-Orthophosphat beträgt in allen Fällen 2 h. Die Inkubationszeiträume erstrecken sich von 1 h bis 3 h, von 4 h bis 6 h, von 10 h bis 12 h und von 22 h bis 24 h seit Beginn der Inkubation der Zellen im Hungermedium (siehe auch Schema über Abb. 23).

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden Proben von je 0,5 ml entnommen und der kalten TCA-Fällung (2.2.6.3.) unterworfen. Das gefällte Zellmaterial wird über silanisierte Glasfaserfilter (siehe S. 34) abgetrennt und die Radioaktivität bestimmt.

Abb. 23 zeigt den Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat in das mit kalter TCA fällbare Zellmaterial. Hierbei handelt es sich, wie später noch gezeigt wird, überwiegend um radioaktiv markierte RNA.

Die in Abb. 23 gezeigten Einbauergebnisse wurden als Mittelwerte aus 4 Bestimmungen zweier unabhängiger Einbauversuche gewonnen. Die Standardabweichungen der Meßwerte von den jeweils zugehörigen Mittelwerten sind eingetragen.

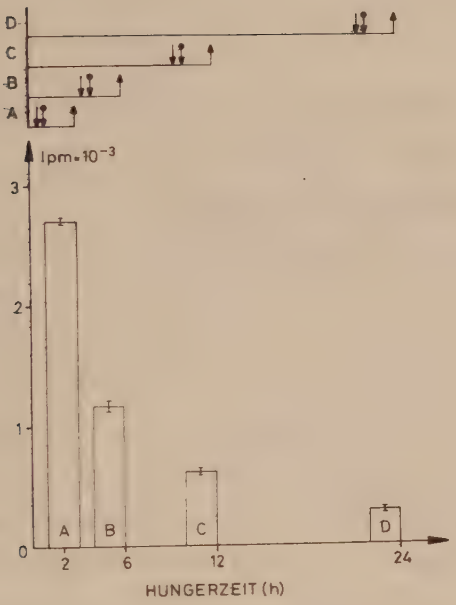


Abb. 23: Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat (0,09 µCi/ml) in *D. discoideum* bei gleichem Phosphatgehalt ($1{,}7 \times 10^{-6}$ M) im Medium (7,5 mM MES-Puffer, pH 6,0) zu verschiedenen Zeiten des Hungers (A, B, C, D) bei 23°C während 2 h. Die Säulen zeigen den aus je vier Werten gemittelten Einbau in 7×10^{6} Zellen aus je 0,5 ml Einbaumedium. Die jeweilige Standardabweichung ist eingetragen.

↓ Wechsel des Hungermediums von 0,017 M Phosphatpuffer auf 7,5 mM MES-Puffer, pH 6,0 mit $1{,}7 \times 10^{-6}$ M Phosphat und Zusatz von Rifampicin und Streptomycinsulfat

↕ Zusatz von (^{32}P)-Orthophosphat

↑ Entnahme der Zellen und kalte TCA-Fällung

Im ersten Inkubationszeitraum werden 3,4 % des angebotenen (^{32}P)-Orthophosphat, in den folgenden noch 1,5 %, 0,8 % und 0,4 % eingebaut. Der (^{32}P)-Orthophosphat-Einbau nimmt demnach mit fortschreitendem Hunger der Zellen

ab. Dies läßt auf eine Abnahme der RNA-Synthese schließen.

3.6.2.5. Untersuchungen des mit (^{32}P)-Orthophosphat markierten Zellmaterials.

a) Dichtegradientenzentrifugation

Die Markierung der hungernden Zellen erfolgt in diesem Experiment in den gleichen Zeitintervallen und unter den gleichen Bedingungen wie in 3.6.2.4.b) beschrieben. Jeder Ansatz enthält in 10,0 ml Puffer etwa $1{,}5 \times 10^8$ Zellen, denen 50 uCi (^{32}P)-Orthophosphat angeboten werden. Nach zweistündiger Inkubationszeit werden die Zellen der einzelnen Ansätze durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und zweimal mit je 5,0 ml 0,017 M Phosphatpuffer, pH 6,0 gewaschen. Die RNA wird extrahiert und gereinigt (2.2.3.2.) und anschließend der Dichtegradientenzentrifugation (2.2.4.) unterworfen.

Abb. 24 zeigt die Verteilung der Radioaktivität im Vergleich zum Verlauf der UV-Absorptionskurve nach der Dichtegradientenzentrifugation.

Zunächst fällt auf, daß die Menge an 28S und 18 S rRNA (Menge an RNA dargestellt durch die Absorption bei λ = 260 nm) mit zunehmender Dauer des Hungers abnimmt. Im Bereich der niedermolekularen RNA (5 S rRNA; tRNA) ist dagegen eine Zunahme der Absorption festzustellen. Besonders deutlich wird dies nach 12 h und 24 h des Hungers (Abb. 24c, d). Möglicherweise handelt es sich hierbei aber auch um eine Anhäufung von Abbauprodukten höhermolekularer RNA.

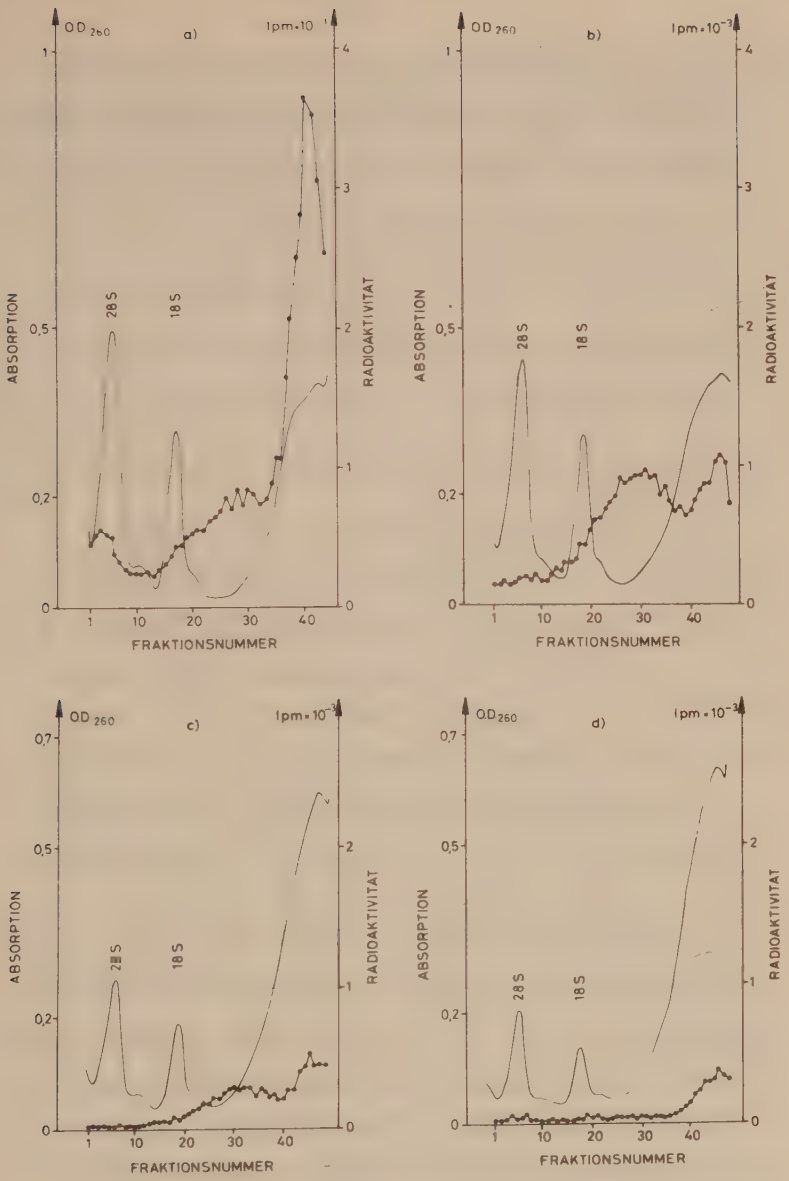


Abb. 24: Dichtegradientenzentrifugation von RNA, die zu verschiedenen Zeiten des Hungers der Zellen (a) von 1 - 3 h, b) von 4 - 6 h, c) von 10 - 12 h, d) von 22 - 24 h) mit (^{32}P)-Orthophosphat bei 23°C in MES-Puffer (7,5 mM, pH 6,0) mit Phosphatzusatz ($1{,}7 \times 10^{-6}$ M) markiert wurde. Zuvor wurden die Zellen 30 min mit Rifampicin und Streptomycinsulfat vorinkubiert. Absorption bei λ = 260 nm ——, Radioaktivität •——•. Die Dichte der Gradienten nimmt von rechts nach links zu.

Der Einbau an (^{32}P)-Orthophosphat in diesem Bereich ist zu gering, um eine derartig massive Veränderung durch Neusynthese zu erklären. Nur zu Beginn des Hungers scheint eine beachtliche Neusynthese niedermolekularer RNA vorzuliegen (Abb. 24a), Fraktionen 36 - 44). Schon nach 4 h des Hungers erkennt man ein deutliches Nachlassen dieser Syntheseleistungen (Abb. 24b), Fraktionen 39 - 48). Geringe Mengen an (^{32}P)-Orthophosphat werden jedoch auch noch nach 22 h seit Beginn der Inkubation der Zellen im Hungermedium in diese niedermolekulare RNA eingebaut.

Auffällig ist die hohe radioaktive Markierung in den Fraktionen 18 - 32 (Abb. 24a)) und den Fraktionen 18 - 37 (Abb. 24b)) während des Markierungszeitraums 1 h bis 3 h und 4 h bis 6 h nach Beginn des Hungers. Später ist, wie Abb. 24c) zeigt, die gemessene Radioaktivität in diesem Bereich geringer. 22 h nach Beginn des Hungers ist kein Einbau mehr festzustellen. In den genannten Fraktionen sollte RNA zu finden sein, deren Sedimentationskonstante größer als 5 S, aber kleiner als 18 S ist. Es handelt sich also um ein - nach den Sedimentationskonstanten - heterogenes Material. Für vegetative Zellen von D. d i s c o i d e u m konnten FIRTEL et al. (48) zeigen, daß die meiste heterodisperse RNA mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit zwischen 6 S und 16 S Poly(A) enthält, und es sich demnach wahrscheinlich um mRNA handelt.

Eine geringe Neusynthese von ribosomaler RNA (28 S und 18 S) ist nach den vorliegenden Markierungsexperimenten

nur während der ersten 3 h der Inkubation der Zellen im Hungermedium festzustellen. Später findet kein Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat in diese RNA-Fraktionen mehr statt (siehe Abb. 24d).

Als Identitätskriterien für die RNA werden folgende Merkmale herangezogen:

1. RNA wird durch die Behandlung mit 1 N NaOH während 24 h bei Raumtemperatur in Mononukleotide zerlegt (37). Dies gilt nicht für DNA.
2. RNA wird durch die Inkubation in heißer TCA während 30 min im siedenden Wasserbad gespalten. Dies gilt nicht für Proteine. Außerdem wird z.B. von phosphoryliertem Serin (O-Phospho-Serin) durch diese Behandlung die Phosphatgruppe nicht abgespalten.

Das mit (^{32}P)-Orthophosphat markierte Zellmaterial, das nach einem Extraktions- und Reinigungsverfahren für RNA gewonnen wurde, entspricht den obigen Kriterien. Die Fällbarkeit dieses Materials geht nach der Behandlung mit 1 N NaOH auf 3,1 % (Standardabweichung s = $\pm$ 1 % bei 6 Meßwerten), verglichen mit der Fällbarkeit ohne NaOH-Behandlung, zurück. Unterwirft man das gleiche Material (ohne Behandlung mit NaOH) der heißen TCA-Fällung, so findet man nur 0,4 % (Standardabweichung s = $\pm$ 0,2 % bei 6 Meßwerten) der ursprünglich mit kalter TCA fällbaren Menge an Radioaktivität im Niederschlag.

Diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen, daß es sich bei dem markierten extrahierten Zellmaterial fast ausschließlich um RNA handelt.

b) Bindung an Poly(U)-Sepharose

Von verschiedenen Organismen wurde in den vergangen Jahren Poly(A)-haltige mRNA isoliert (42, 49, 50). Für D. d i s c o i d e u m konnten FIRTEL et al. (51) zeigen, daß mRNA, die sie aus Polyribosomen isolierten, Sequenzen von Polyadenylsäure enthält. Die genannten Autoren bedienten sich der Poly(U)-Sepharose, um die Poly(A)-haltige RNA von der übrigen zu trennen. Unter den Versuchsbedingungen. bilden sich Hybride von Poly(U)- und Poly(A)-Sequenzen aus.

In eigenen Untersuchungen wurde nach der von HENDLER et al. (42) beschriebenen Technik der Affinitätschromatographie Poly(A)-haltiger RNA an Poly(U)-Sepharose-Säulen verfahren (siehe 2.2.5.). Die aufgetragene RNA-Präparation ist durch ihr Verhalten bei der Dichtegradientenzentrifugation charakterisiert (Abb. 25a)).

Abb. 25 b) zeigt, daß die Hauptmenge des mit (^{32}P)-Orthophosphat markierten Materials unter den Versuchsbedingungen nicht gebunden wird. Dies ist auch zu erwarten, daß die Hauptmenge des markierten Materials nicht die für mRNA charakteristische Sedimentationsgeschwindigkeit zeigt. Etwa 21 % der aufgetragenen Radioaktivität bindet jedoch an die Poly(U)-Sepharose und kann mit einer 90 %igen Formamidlösung von der Säule eluiert werden. In parallelen Versuchen wird zwischen 20 % und 26 % der Radioaktivität an die Poly(U)-Sepharose gebunden und ist anschließend mit 90 %iger Formamidlösung zu eluieren.

Dieses Ergebnis zeigt, daß ein Teil der radioaktiv markierten RNA Poly(A)-Sequenzen enthält und es sich demnach um mRNA handelt.

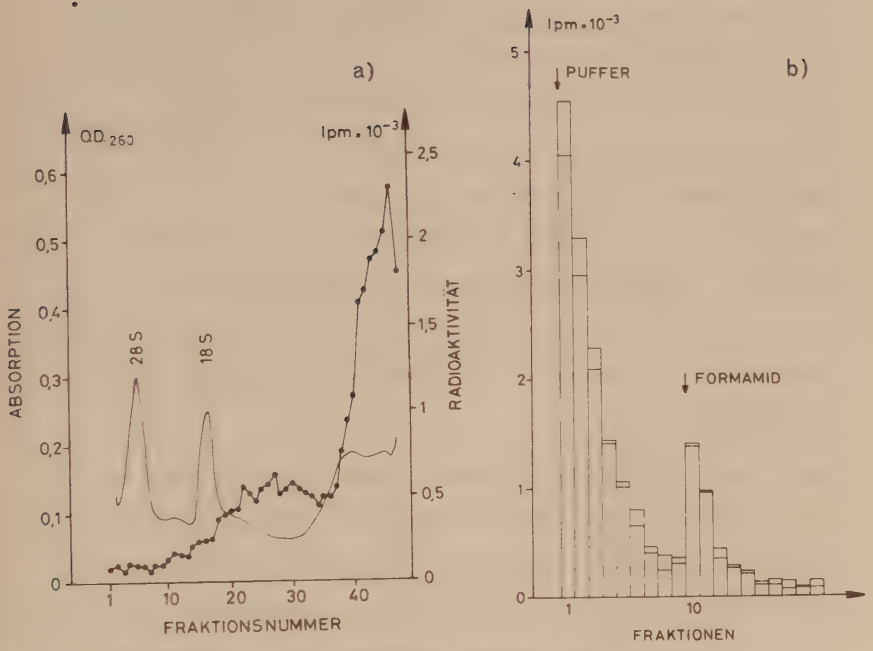


Abb. 25a): Dichtegradientenzentrifugation von RNA aus D. d i s c o i d e u m , die während des Hungers mit (^{32}P)-Orthophosphat markiert wurde. (Bedingungen wie bei Abb. 24). Absorption bei λ = 260 nm ——— , Radioaktivität •———• .

b): Auftrennung des gleichen Materials mit Hilfe von Poly(U)-Sepharose. Dargestellt ist die Radioaktivität in den Fraktionen zweier Bestimmungen.

3.6.2.6. Abbau radioaktiv markierter RNA während der Inkubation im Hungermedium und während der Differenzierung der Zellen auf Phosphat-Agar-Platten

Für diese Untersuchungen wird die RNA logarithmisch wachsender Amöben mit (5,6-^{3}H)-Uracil markiert. Je ml

der logarithmisch wachsenden Amöbensuspension werden nach 30-minütiger Vorinkubation 4 µCi (5,6-^{3}H)-Uracil (spezifische Radioaktivität 44 Ci/mmol) zugesetzt. Nach 6-stündiger Inkubationszeit werden die Zellen abzentrifugiert und gewaschen. In parallelen Ansätzen werden in 25,0 ml Hungermedium etwa $2x10^{8}$ radioaktiv markierte Amöben suspendiert. Jedem Ansatz werden 12,5 mg Streptomycinsulfat zur Vermeidung bakterieller Kontamination zugesetzt. Die Ansätze werden bei 22°C geschüttelt.

Zwei der Ansätze werden sofort wieder abzentrifugiert und gewaschen. Die Amöben werden bei -20°C eingefroren. Sie dienen später als Kontrolle um festzustellen, wieviel radioaktiv markiertes Uracil zu Beginn der Hungerzeit in der RNA der Amöben vorhanden war. Weitere Ansätze werden 6, 12, 18 und 24 h nach Hungerbeginn abzentrifugiert, gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Die Amöben, die auf Phosphat-Agar-Platten (2.1.2.1.2.) ausdifferenzieren sollen, werden wie unter 2.2.1.6. beschrieben, auf die Agarplatten gebracht. Auf jede Agarplatte werden auf diese Weise $1x10^{8}$ Amöben übertragen. Für eine Probe werden die Zellen von jeweils 2 Agarplatten, also wieder wie oben $2x10^{8}$ Zellen genommen. Nach verschiedenen Zeiten der Differenzierung (0, 6, 12, 18 und 24 h) bei senkrecht auffallendem Licht und 22°C werden die Zellen mit 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 unter Zuhilfenahme eines Drigalski-Spatels von den Agarplatten gewaschen. Während des Zeitraums von 24 h läuft der

ganze Differenzierungszyklus (siehe auch Abb. 1) ab.

Die RNA der Zellen der einzelnen Proben wird extrahiert und gereinigt.

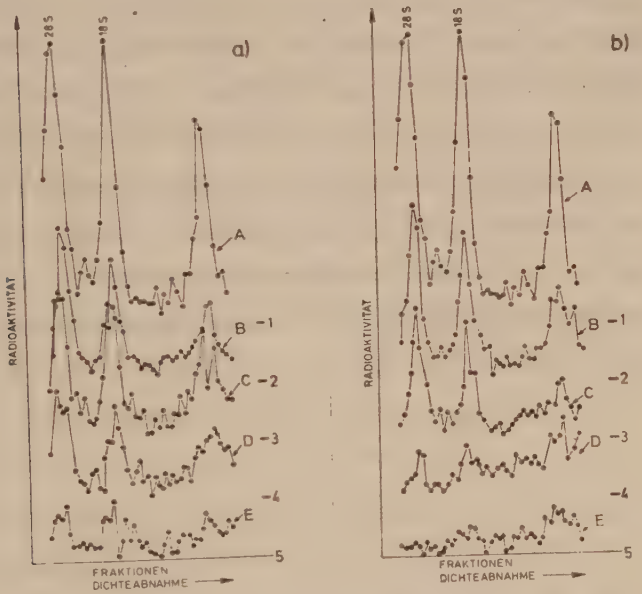


Abb. 26: Verteilung der Radioaktivität in der RNA aus D. d i s c o i d e u m nach Dichtegradientenzentrifugation. a) Abbau der mit (5,6-^{3}H)-Uracil markierten RNA während der Inkubation in flüssigem Hungermedium; b) Abbau der radioaktiv markierten RNA während der Differenzierung auf fester Oberfläche. (Die Zahlen bezeichnen die jeweiligen Grundlinien der Gradienten; 1 für A, 2 für B, 3 für C, 4 für D und 5 für E. Die Proben sind nach 0 h (A), 6 h (B), 12 h (C), 18 h (D) und 24 h (E) genommen.

Die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen RNA-Arten nach unterschiedlich langer Inkubationszeit der Zellen in flüssigem Hungermedium (Abb. 26a) und während

des Differenzierungszyklus der Zellen auf fester Oberfläche (Abb. 26b) wird mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Es zeigt sich, daß die Abnahme der Radioaktivität alle RNA-Arten in gleicher Weise betrifft. Hier wird deutlich, daß der Abbau der mit (5,6-^{3}H)-Uracil während des logarithmischen Wachstums markierten RNA in beiden Systemen in ähnlicher Weise abläuft. Wesentliche Unterschiede sind nicht festzustellen. Auffällig ist nur, daß der Abbau vormarkierter RNA in Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren, schon nach 12 h weiter fortgeschritten ist als in Zellen, die im flüssigen Hungermedium inkubiert werden.

4. DISKUSSION

Zahlreiche Untersuchungen an D. d i s c o i d e u m befassen sich mit biochemischen Vorgängen während der Differenzierung von Amöben zu Sporen und Sporenträgern auf fester Oberfläche. Dabei wird dem Stoffwechsel der Makromoleküle (Proteine, Kohlenhydrate und Polynukleotide) während dieses Abschnitts der Entwicklung besondere Beachtung geschenkt.

In der vorliegenden Arbeit wird der Stoffwechsel der Zellen in einem Zeitraum untersucht, der zwischen die vegetative Vermehrung und die Differenzierung auf fester Oberfläche eingeschoben wird. Diese Zwischenphase besteht in einer Inkubation der Zellen in einem flüssigen Hungermedium. Diesem Medium fehlen die Zellen von E. c o l i B/2 als Substrat für die Amöben.

Die Untersuchungen über die Konstanz der Zellzahl im Hungermedium (3.2.) zeigen, daß nur eine geringe Abnahme der Zellzahl (etwa 3,5% in 24 h) eintritt. Eine Vermehrung der Zellen durch Zellteilungen nach Beginn der Inkubation der Zellen im Hungermedium wird nicht beobachtet. Das stimmt mit Ergebnissen von BONNER et al. (52) überein, die besagen, daß Zellen von D. d i s c o i d e u m nach Übertragen auf nährstofffreies Medium nur in sehr geringem Maße Mitosen zeigen. Erhärtet wird dies durch Befunde von KATZ et al. (53), aus denen hervorgeht, daß die Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus aggregieren. Eine Mitose erfolgt nur

in den Zellen, die sich beim Abtrennen vom Nährmedium schon in der späten G2-Phase befinden.

Im flüssigen Hungermedium werden die Zellen innerhalb von 8 - 10 h aggregationsreif. Werden sie auf eine feste Oberfläche gebracht, so beginnen sie in kürzester Zeit mit der Fruchtkörperbildung. Nicht aggregationsreife Zellen treten erst in eine Latenzphase ein (28). Aggregationsreife und nicht aggregationsreife Zellen unterscheiden sich außerdem in ihrem Verhalten gegenüber EDTA. Die interzellulären Kontakte aggregationsreifer Zellen werden durch EDTA nicht beeinflußt. Bei noch nicht aggregationsreifen Zellen verhindert EDTA das unspezifische Verklumpen (die Agglutination) der Zellen (29).

Aus aggregationsreifen Zellen konnten von WILHELMS et al. (54) hauptsächlich zwei antigene Makromoleküle, ein Glykolipid und ein Glykoprotein, isoliert werden. In vegetativen Zellen dagegen wurde im wesentlichen nur das antigene Glykolipid gefunden. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Aggregationskompetenz der Zellen und dem antigenen Material. SIMPSON et al. (55) berichten von einem kohlenhydratbindenden Protein (Discoidin), das von D. d i s c o i d e u m synthetisiert wird,wenn die Zellen kohäsiv werden. Sie nehmen an, daß dieser Faktor bei der Zelladhäsion eine wesentliche Rolle spielt. SUSSMAN et al. (56) konnten an "Ghosts" zeigen, daß in D. d i s c o i d e u m die Zelladhäsion durch eine einfache Wechselbeziehung

zwischen Plasmamembranen zustande kommt. Als Kofaktoren wirken hierbei einige zweiwertige Kationen. "Ghosts", die von aggregationsreifen oder nicht aggregationsreifen Zellen gewonnen werden, unterscheiden sich in der Art und Festigkeit der Zellkontakte. Es werden auf den Zelloberflächen zwei Arten von Bindungsstellen angenommen. Zellkontakte der nicht aggregationsreifen "Ghosts" sind durch EDTA aufzulösen, die der aggregationsreifen nicht. Diese Eigenschaft macht es auch unmöglich, Zellzählungen nach etwa 8 h der Inkubation der Zellen im Hungermedium durchzuführen, da die gebildeten Aggregate nicht mehr durch EDTA in Einzelzellen zerlegbar sind (siehe 2.2.2.1.).

Die Umwandlung zu aggregationsreifen Zellen durch Inkubation im flüssigen Hungermedium ist ein Zeichen dafür, daß die Zellen während dieser Zeit eine Reihe biochemischer Veränderungen durchlaufen.

Überträgt man die Zellen nach verschieden langer Zeit der Inkubation im Hungermedium auf die Oberfläche einer nährstoffreien Agarplatte, so läuft die makroskopisch sichtbare Differenzierung ab. Die Ausbildung der reifen Sporenträger dauert im Normalfall 24 h. Schiebt man die Inkubationsphase im Hungermedium ein, so verkürzt sich die Differenzierungszeit auf der festen Oberfläche etwa um die Zeit der Inkubation im Hungermedium, maximal jedoch um etwa 8 h (Abb. 8, 9). In der Zeit der Inkubation im flüssigen Hungermedium

müssen also in den Zellen Stoffwechselvorgänge stattgefunden haben, die einen schnelleren Ablauf der morphologischen Differenzierung zur Folge haben.

Der Stoffwechsel in Zellen von D. d i s c o i d e u m während der Differenzierung ist obligat aerob (6). GREGG stellt fest, daß die Atmungsaktivität von Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren, während der Migrationsphase, der Praekulminationsphase und der beginnenden Kulminationsphase konstant ist. Er mißt einen mittleren O_2-Verbrauch von 0,163 µl O_2/h/µg N = 27,2 µl O_2/h/mg Protein. Während des weiteren Ablaufs der Differenzierung tritt ein linearer Abfall der Atmungsaktivität ein. Reife Sporenträger haben keine meßbare Atmungsaktivität. Der Sauerstoffverbrauch zeigt also einen ähnlichen Verlauf wie die Stoffwechselintensität (6).

In der vorliegenden Arbeit wird eine kontinuierliche Abnahme der Zellatmung bei D. d i s c o i d e u m während der Inkubation im Hungermedium beschrieben. So fällt in 13 h (zwischen der sechsten und der neunzehnten Stunde der Inkubation) die Sauerstoffaufnahme von 85 auf 43 µl O_2/h/mg Protein, d.h., auf etwa die Hälfte ab (Abb. 10). Hieraus läßt sich auf eine Abnahme der Intensität des Stoffwechsels während der Inkubation der Zellen im Hungermedium schließen.

Hungernde Zellen mit einem hohen Sauerstoffverbrauch, d.h. einer hohen Stoffwechselintensität, müssen

Reservestoffe umsetzen, um ihren Energiebedarf zu decken. Der Abbau der Reservestoffe zeigt sich in einer Abnahme des Trockengewichtes der Zellen. WHITE et al. finden bei Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren, während des gesamten Differenzierungszeitraums Trockengewichtsabnahmen von 40 - 70 % (24).

Während 24-stündiger Inkubation im flüssigen Hungermedium nimmt das Trockengewicht der Zellen um 35 % ab (Abb. 12). Hieraus geht hervor, daß während der Hungerphase im flüssigen Medium ein Stoffumsatz abläuft, der größenordnungsmäßig nur wenig unter dem Umsatz bzw. der Substanzabnahme während der Differenzierung auf fester Oberfläche liegt.

Zusätzlich zum Abbau von Reservestoffen kann das Trockengewicht durch die Abgabe von Substanzen an das Medium verringert werden. Während der Inkubationszeit im Hungermedium stellt man eine Zunahme der Absorption im UV-Bereich mit einem Maximum bei λ = 328 nm fest. Die Absorption steigt von der neunten bis zur sechzehnten Stunde um das Fünffache an (Abb. 11). Die UV-absorbierenden Stoffe sind nicht mit TCA fällbar. Demnach dürfte es sich nicht um Proteine oder um proteingebundene Metabolite handeln.

Innerhalb der ersten 6 h der Inkubation im Hungermedium lassen sich keine Folin-positiven Substanzen im Medium feststellen. Nach weiteren 6 h beträgt die Menge Folin-positiver Substanzen (berechnet als Protein) etwa 5 %

des Trockengewichts. Die Veränderung der Größen UV-Absorption und Proteingehalt sprechen für eine Abgabe von Stoffen aus dem Zellinnern an das Medium.

Große Veränderungen des Proteingehalts findet man innerhalb der Zellen sowohl während des normal ablaufenden Differenzierungszyklus als auch während der Inkubationszeit der Zellen im Hungermedium.

Hames et al. (27) stellen während des Ablaufs des Differenzierungszyklus bei Zellen des axenischen Stammes ax-2 einen Abfall des säurelöslichen Proteins von 10 - 12 mg/10^8 Zellen auf 3,0 - 3,5 mg/10^8 Zellen fest. Das entspricht einer Abnahme um etwa 70 %. WHITE et al. (24) bestimmen zu Beginn der Differenzierung 5,64 mg Protein/10^8 Zellen des Stammes NC-4, nach Beendigung derselben 1,93 mg Protein/10^8 Zellen. Für Amöben des Stammes NC-4, die auf A e r o b a c t e r a e r o g e n e s angezüchtet wurden, wird ein Proteingehalt von 7,8 ± 0,6 mg/10^8 Zellen angegeben (57). Der Proteingehalt vegetativer Zellen ist demnach in starkem Maße sowohl vom jeweils untersuchten Stamm als auch von den Ernährungsbedingungen abhängig.

In den eigenen Untersuchungen (Abb. 12) wird für 10^8 Zellen ein Initialgehalt an Protein von 8,4 ± 0,46 mg (= 61 % des Trockengewichts) festgestellt. Nach 24 h werden noch 5,7 ± 0,4 mg (= 63 % des Trockengewichts) gefunden. Der Proteinverlust von 32 % während einer Inkubationszeit im Hungermedium von 24 h ist geringer als in den oben zitierten Ergebnissen.

Protein, das während des Hungers mit (1-^{14}C)-Leucin markiert wurde, zeigt von der 6. bis zur 24. Stunde nach Beginn des Hungers eine Abnahme der Radioaktivität um 59 % (siehe 3.6.1.3.). Die Radioaktivität aus den abgebauten Proteinen erscheint nicht in anderen Zellinhaltsstoffen, sondern wird als $^{14}CO_2$ freigesetzt.

Daß während der Inkubation der Zellen im flüssigen Hungermedium Proteine aber nicht nur abgebaut, sondern auch neu synthetisiert werden, zeigen die in 3.6.1.2. beschriebenen Untersuchungen. Exogenes (1-^{14}C)-Leucin wird sowohl im Zeitraum von 0,5 - 6,5 h als auch in dem von 6 - 12 h nach Beginn der Inkubation im flüssigen Hungermedium in Proteine eingebaut. Proteinabbau und -neusynthese laufen also parallel. Ob der Proteinabbau aus Gründen der Energiegewinnung geschieht, oder ob bestimmte Proteine abgebaut werden, um anderen Platz zu machen, damit spezifische Veränderungen der Zellen gewährleistet werden, ist nicht eindeutig zu klären.

HAMES et al. (27) postulieren nach ihren Untersuchungen am Stamm ax-2 die zweite der oben genannten Möglichkeiten. Der Stamm ax-2 ist in der Lage, aus dem Medium Glucose aufzunehmen und in Glykogen umzuwandeln. Der intrazelluläre Glykogengehalt ist in gewissen Grenzen umso höher, je mehr Glucose im Medium angeboten wird. Er kann zwischen 0,05 und 5 mg/1x10^8 Zellen liegen. Bei hohen Konzentrationen von Glykogen, das während des Wachstums gespeichert wurde, wird die Hauptmenge während der Diffe-

renzierung abgebaut. Eine Anhäufung von Glucose ist dabei nicht festzustellen. Es ist den Zellen möglich, ihren Energiebedarf aus dem abgebauten Glykogen (bzw. der Glucose) zu decken. Die Autoren stellen fest, daß unabhängig von der Menge des zur Verfügung stehenden Glykogens Protein immer im gleichen Maße abgebaut wird und schließen daraus, daß die Proteine wahrscheinlich nicht zur Deckung des Energiebedarfs während der Differenzierung abgebaut werden müssen. Es müsse vielmehr (s.o.) die Notwendigkeit zum Abbau bestimmter Proteine bestehen, um die Differenzierung zu ermöglichen.

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Stamm NC-4 kann dagegen keine wesentlichen Mengen löslicher Kohlenhydrate speichern. Der Hauptanteil der löslichen Kohlenhydrate ist Glykogen (23). Der Gehalt zu Beginn der Inkubation im flüssigen Hungermedium ist mit 0,23 ± 0,05 mg/10^8 Zellen recht gering. Während der ersten 6 h ist eine Zunahme auf 0,37 ± 0,02 mg/10^8 Zellen festzustellen (Abb. 13). Danach jedoch fällt der Gehalt an Glykogen ab. WHITE et al. (24) finden während des ganzen Differenzierungszyklus von Wildstammzellen keine Veränderungen im Gehalt an anthronpositivem Material. Er entspricht Werten zwischen 0,4 und 0,5 mg Glucose für 10^8 Zellen. In mutierten Stämmen, die nicht aggregieren oder keine Fruchtkörper ausbilden können, ist jedoch sofort nach Übertragen der Zellen auf eine feste Oberfläche ein Abfall des anthronpositiven Materials festzustellen (24).

Während der Differenzierung der Zellen auf fester Oberfläche geht der Proteinsynthese in den meisten Fällen die Synthese von RNA voraus. Dies konnte für verschiedene Enzyme durch den Einsatz des Antibiotikums Actinomycin D gezeigt werden (17, 18, 19, 20, 21). Durch Actinomycin D wird die Synthese aller RNA-Arten gehemmt, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Mit Hilfe von Markierungsversuchen gelang es FIRTEL et al. (51) in Zellen des axenischen Stammes ax-3 während der Morphogenese auf fester Oberfläche die Neusynthese von mRNA während dieses Zeitraumes zu beweisen.

Während 24-stündiger Inkubation der Zellen im Hungermedium nimmt der Gehalt an RNA, deren quantitativ größter Anteil rRNA ist, von 2,25 ± 0,07 mg/10^8 Zellen auf 1,3 ± 0,28 mg/10^8 Zellen ab. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme um 42 % (siehe 3.3.). WHITE et al. (24) finden während der Differenzierung der Zellen auf fester Oberfläche ebenfalls eine starke Abnahme der Gesamt-RNA. COCUCCI et al. (58), die den Umsatz von Ribosomen und von rRNA des axenischen Stammes ax-1 untersuchen, kommen zu dem Ergebnis, daß während des Differenzierungszyklus der Zellen auf fester Oberfläche mindestens 75 % der Ribosomen abgebaut werden und teilweise durch neugebildete ersetzt werden. In den vorliegenden Experimenten zeigt sich während des Differenzierungszyklus ein Abbau der während des Wachstums mit (5,6-^{3}H)-Uracil markierten RNA um etwa 90 %, während der Inkubation im flüssigen Hungermedium werden im gleichen Zeitraum ungefähr 80 % der

zu Beginn der Inkubation vorhandenen radioaktiv markierten RNA abgebaut (siehe 3.6.2.6.). Abb. 26 zeigt, daß beim Abbau der RNA alle Arten (- der Hauptanteil der radioaktiven Markierung befindet sich in den rRNA-Arten -) in der gleichen Weise betroffen sind. Bis 6 h nach Beginn des Hungers ist der Abbau der radioaktiv markierten RNA in Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren, ebensoweit fortgeschritten wie in Zellen, die im flüssigen Hungermedium inkubiert werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigen sich geringfügige Unterschiede in der Umsetzung der radioaktiv markierten RNA. Zellen, die im flüssigen Medium inkubiert werden, zeigen nach 6 - 12 h einen etwas geringeren RNA-Umsatz als Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren.

Durch den Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat wird eine RNA-Neusynthese während der Inkubation der Zellen im Hungermedium nachgewiesen (3.6.2.4. und 3.6.2.5. a)). Die Menge der in gleichen Zeiträumen neusynthetisierten RNA nimmt jedoch mit zunehmender Dauer der Hungerzeit ab. Die Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 24) zeigt, daß nur bis etwa 3 h nach Beginn der Inkubation eine geringe Menge an rRNA (28S und 18S) gebildet wird. Die Synthese dieser rRNA-Arten wird unter den Versuchsbedingungen in späteren Hungerstadien nicht mehr beobachtet. FIRTEL et al. (51) können dagegen in Zellen des Stammes ax-3, die auf fester Oberfläche differenzieren, noch zwischen 14 h und 16,5 h seit Beginn der Differenzierung durch Einbau von (^{32}P)-Orthophosphat rRNA-Synthese zeigen.

Auffällig hoch ist in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten System jedoch der Anteil der (^{32}P)-Markierung in RNA-Fraktionen mit Sedimentationskoeffizienten kleiner als 18S und größer als 5S. Hierbei handelt es sich, wie aus Hybridisierungsversuchen mit Poly(U)-Sepharose hervorgeht, um Poly(A)-haltige RNA, also um mRNA (3.6.2.5. b)). Eine deutliche (^{32}P)-Markierung der mRNA ist bis 6 h nach Hungerbeginn zu beobachten. Diese Synthese scheint noch etwa weitere 6 h in vermindertem Umfang anzudauern, um danach gänzlich aufzuhören. Ferner ist in den ersten 3 h der Inkubation der Zellen im Hungermedium eine intensive Markierung mit (^{32}P)-Orthophosphat in den RNA-Fraktionen feststellbar, die die 5S rRNA und die tRNA enthalten. Die radioaktive Markierung in diesen Fraktionen nimmt im weiteren Verlauf der Hungerzeit ab, kommt jedoch im ganzen untersuchten Zeitraum nicht völlig zum Erliegen.

Ein entscheidender Unterschied in den Syntheseleistungen von Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren und solchen, die im flüssigen Hungermedium inkubiert werden, ist der frühe, nach etwa 3 h erfolgende Abbruch der rRNA-Synthese (28S und 18S) unter den zuletzt genannten Bedingungen. Der gleichzeitig einsetzende drastische Abbau von rRNA, die noch in der vegetativen Phase gebildet wurde (3.6.2.6.), könnte zusammen mit dem Fehlen einer Neusynthese als eine der Ursachen für das Ausbleiben der Differenzierung angesehen werden. Von großer Bedeutung ist sicher auch die zwischen 6 h und 12 h des

Hungers eintretende Verringerung der mRNA-Synthese, die ja danach zwischen der 12. und der 24. Stunde des Hungers völlig eingestellt wird. So wird möglicherweise nur ein Teil der genetischen Information für das Differenzierungsprogramm bereitgestellt.

Warum eine bis zu 8-stündige Inkubation der Zellen im Hungermedium vor dem Übertragen der Zellen auf eine feste Oberfläche eine der Inkubationszeit entsprechende Verkürzung des nun ablaufenden Differenzierungszyklus zur Folge hat (siehe auch 3.3.), ließe sich vielleicht so erklären: Die oder doch zumindest ein wesentlicher Teil der bis zu einer bestimmten Zeit neusynthetisierten mRNA wird sogleich abgelesen und in die entsprechenden Proteine übersetzt. Hierfür spricht die Proteinsynthese (3.6.1.2.) und die Ausbildung der Oberflächenkomponenten (2.2.2.1.), die für die Ausbildung der EDTA-resistenten Zellkontakte benötigt werden. Möglicherweise wird auch ein Teil der neusynthetisierten mRNA für einen gewissen Zeitraum intakt erhalten, um dann, wenn die Zellen nach der Inkubation im Hungermedium auf eine feste Oberfläche übertragen werden und das morphologisch sichtbare Differenzierungsprogramm ablaufen kann, sofort abgelesen zu werden.

In dieser Arbeit sind Stoffwechselveränderungen in Zellen von D. d i s c o i d e u m untersucht worden, die in einem flüssigen Hungermedium gehalten werden, wo der Ablauf des normalen Differenzierungszyklus nicht

möglich ist. Es wird jedoch gezeigt, daß die Differenzierung der Zellen im flüssigen Hungermedium eingeleitet wird und bis zu einer bestimmten Stufe abläuft. Von dieser Stufe aus kann eine Ausdifferenzierung der Zellen auf fester Oberfläche erfolgen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß einer Inkubation in flüssigem Hungermedium auf Zellen von D. d i s c o i d e u m NC-4 wird untersucht. Das flüssige Hungermedium besteht aus einem 0,017 M Phosphatpuffer pH 6,0 ohne jegliches Nährsubstrat. In diesem Medium sind Wachstum und Vermehrung der Amöben nicht möglich. Ebenso kann der normale Differenzierungszyklus der Zellen, der zu reifen Sporenträgern mit den darin enthaltenen Sporen führt, in diesem Medium nicht ablaufen.

Eine Inkubation der Zellen in flüssigem Hungermedium läßt eine nachfolgende Ausdifferenzierung der Zellen auf fester Oberfläche schneller ablaufen. Die Verkürzung des nachfolgenden Differenzierungsprozesses ist von der Dauer der Inkubation der Zellen im flüssigen Hungermedium abhängig und dieser bis zu einer Inkubationszeit von etwa 8 h proportional. Ein Teil der Differenzierung der Zellen zu Sporenträgern und Sporen kann also im flüssigen Medium vorweggenommen werden.

Während der Inkubation in flüssigem Medium treten in den Zellen charakteristische Stoffwechselveränderungen ein. In den ersten 6 h der Inkubation ist eine Zunahme der löslichen Kohlenhydrate (Glykogen) feststellbar; später ist eine Abnahme feststellbar. Während der gesamten Inkubationszeit in flüssigem Hungermedium werden in beträchtlichem Maße Proteine und RNA abgebaut. Diese Vorgänge sind von Trockengewichtsverlusten begleitet.

Verfolgt werden Veränderungen der Gesamt-RNA, deren Hauptanteil die ribosomalen RNA-Arten darstellen.

Während der Hungerperiode in flüssigem Medium werden in den Zellen sowohl Proteine wie RNA neu synthetisiert. Der Nachweis der Proteinsynthese gelingt über den Einbau von (1-^{14}C)-Leucin. Markierungsversuche mit (^{32}P)-Orthophosphat zeigen eine rRNA-Synthese bis etwa 3 h nach Beginn des Hungers. Außerdem kann die Neusynthese von mRNA gezeigt werden.

In den ersten Stunden der Inkubation im Hungermedium laufen in den Zellen Veränderungen ab, die qualitativ und quantitativ den Veränderungen in Zellen, die auf fester Oberfläche differenzieren, sehr ähnlich sind. Sobald die Zellen auf eine feste Oberfläche übertragen werden, können sie ohne Verzögerung von dem erreichten Zustand weiter ausdifferenzieren.

Insgesamt zeigen die vorgelegten Experimente, daß der morphologisch faßbaren Differenzierung von D. d i s c o i d e u m eine Phase vorausgeht, in der die Zellen auf den eigentlichen Differenzierungsprozeß vorbereitet werden. Die in dieser Phase ablaufenden Stoffwechselveränderungen sind nicht an eine feste Oberfläche gebunden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. RAPER, K.B.
Dictyostelium discoideuum, a new species of slime mold from decaying forest leaves.
J. Agr. Res. 50, 135 - 147 (1935)

2. BONNER, J.T.
The cellular slime molds.
2nd edition,(Princeton University Press, Princeton)(1967)

3. WATTS, D.J. & ASHWORTH, J.M.
Growth of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture.
Biochem. J. 119, 171 - 174 (1970)

4. WARD, J.M.
Biochemical systems involved in differentiation of the fungi.
In: Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Vienna, 1958 Vol. VI, ed. HOFFMANN-OSTENHOF, O. (Pergamon Press, London, New York, Paris, Los Angeles) 33 - 64 (1959)

5. BONNER, J.T. & FRASCELLA, E.B.
Variations in cell size during the development of the slime mold Dictyostelium discoideum.
Biol. Bull. 104, 297 - 300 (1953)

6. GREGG, J.H.
Oxygen utilization in relation to growth and morphogenesis of the slime mold Dictyostelium discoideum.
J. Exp. Zool. 114, 173 - 196 (1950)

7. DURSTON, A.J.
Pacemaker activity during aggregation in Dictyostelium discoideum.
Develop. Biol. 37, 225 - 235 (1974)

8. BONNER, J.T.
Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum.
J. Exp. Zool. 106, 1 - 26 (1947)

9. KONIJN, T.M., van de MEENE, J.G.C., BONNER, J.T. & BARKLEY, D.S.
The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 58, 1152 - 1154 (1967)

10. KONIJN, T.M., BARKLEY, D.S., CHANG, Y.Y. & BONNER, J.T.
Cyclic AMP: a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds.
Amer. Natur. 102, 225 - 233 (1968)

11. EPSTEIN, P.
Cyclic AMP and pattern formation.
Nature 251, 572 (1974)

12. NEWELL, P.C.
The development of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum: A model system for the study of cellular differentiation.
In: Essays in Biochemistry 7, 87 - 126 (1971), eds. CAMPBELL, P.N. & DICKENS, F. (Academic Press, London and New York)

13. BONNER, J.T.
The pattern of differentiation in amoeboid slime molds.
Amer. Natur. 86, 79 - 89 (1952)

14. GARROD, D. & ASHWORTH, J.M.
Development of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum.
In: Microbial differentiation, eds. ASHWORTH, J.M & SMITH, J.E. (Cambridge University Press, Cambridge, G.B.) 407 - 435 (1973)

15. MAEDA, Y. & MAEDA, M.
Heterogeneity of the cell population of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum before aggregation, and its relation to the subsequent locations of the cells.
Exp. Cell Res. 84, 88 - 94 (1974)

16. BONNER, J.T. & SLIFKIN, M.K.
A study of the control of differentiation: the proportions of stalk and spore cells in the slime mold Dictyostelium discoideum.
Amer. J. Bot. 36, 727 - 734 (1949)

17. LOOMIS, W.F., JR.
Developmental regulation of alkaline phosphatase in Dictyostelium discoideum.
J. Bacteriol. 100, 417 - 422 (1969)

18. PONG, S.S. & LOOMIS, W.F., JR.
Enzymes of amino acid metabolism in Dictyostelium discoideum.
J. Biol. Chem. 246, 4412 - 4416 (1971)

19. FIRTEL, R.A. & BRACKENBURY, R.W.
Partial characterization of several protein and amino acid metabolizing enzymes in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum.
Develop. Biol. 27, 307 - 321 (1972)

20. LOOMIS, W.F., JR.
Acetylglucosaminidase, an early enzyme in the development of Dictyostelium discoideum.
J. Bacteriol. 97, 1149 - 1154 (1969)

21. ASHWORTH, J. & SUSSMAN, M.
The appearance and disappearance of uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity during differentiation of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum.
J. Biol. Chem. 242, 1696 - 1700 (1967)

22. HAMES, B.D., WEEKS, G. & ASHWORTH, J.M.
Glycogen synthetase and the control of glycogen synthesis in the cellular slime mould Dictyostelium discoideum during cell differentiation.
Biochem. J. 126, 627 - 633 (1972)

23. ROSNESS, P.A. & WRIGHT, B.E.
In vivo changes of cellulose, trehalose and glycogen during differentiation of Dictyostelium discoideum.
Arch. Biochem. Biophys. 164, 60 - 72 (1974)

24. WHITE, G.J. & SUSSMAN, M.
Metabolism of major cell components during slime mold morphogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 53, 285 - 293 (1961)

25. GREGG, J.H., HACKNEY, A.L. & KRIVANEK, J.O.
Nitrogen metabolism of the slime mold Dictyostelium discoideum during growth and morphogenesis.
Biol. Bull. 107, 226 - 235 (1954)

26. PANNBACKER, R.G.
RNA metabolism during differentiation in the cellular slime mold.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 340 - 345 (1966)

27. HAMES, B.D. & ASHWORTH, J.M
The metabolism of macromolecules during the differentiation of myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum containing different amounts of glycogen.
Biochem. J. 142, 301 - 315 (1974)

28. GERISCH, G.
Zellfunktionen und Zellfunktionswechsel in der Entwicklung von Dictyostelium discoideum. IV. Der Zeitplan der Entwicklung.
Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organ. 153, 603 - 620 (1962)

29. GERISCH, G.
Die zellulären Schleimpilze als Objekte der Entwicklungsphysiologie.
Ber. Dt. Bot. Ges. 75, (82) - (89) (1962)

30. WARD, C. & WRIGHT, B.E.
Cell-wall synthesis in Dictyostelium discoideum.
I. In vitro synthesis from uridine diphosphoglucose.
Biochemistry -USA- 4, 2021 - 2027 (1965)

31. GERISCH, G.
Ein Submerskulturverfahren für entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Dictyostelium discoideum.
Naturwissenschaften 46, 654 - 656 (1959)

32. TAKEUCHI, I. & YABUNO, K.
Disaggregation of slime mold pseudoplasmodia using EDTA and various proteolytic enzymes.
Exp. Cell Res. 61, 183 - 190 (1970)

33. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J.
Protein measurements with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

34. KEPPLER, D. & DECKER, K.
Glykogen-Bestimmung mit Amyloglucosidase.
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, 2. Auflage, ed. BERGMEYER, H.U. (Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.) 1089 - 1099 (1970)

35. HODGE, J.E. & HOFREITER, B.T.
Determination of reducing sugars and carbohydrates.
In: Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. I, eds. WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. (Academic Press, New York and London) 380 - 394 (1962)

36. BEAVEN, G.H., HOLIDAY, E.R. & JOHNSON, E.A.
Optical properties of nucleic acids and their components.
In: The Nucleic Acids, Vol. I, eds. CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N. (Academic Press Inc., New York) 493 - 553 (1955)

37. LORING, H.S.
Hydrolysis of nucleic acids and procedures for the direct estimation of purine and pyrimidine fractions by adsorption spectrometry.
In: The Nucleic Acids, Vol. I, eds. CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N. (Academic Press Inc., New York) 191 - 209 (1955)

38. SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S.J.
A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues.
J. Biol. Chem. 161, 83 - 89 (1945)

39. ROBERTS, R.B., ABELSON, P.H., COWIE, D.B., BOLTON, E.T. & BRITTEN, R.J.
Studies of biosynthesis in Escherichia coli.
(Carnegie Institution of Washington Publication 607, Washington,D.C.) 13 - 30 (1955)

40. FIRTEL, R.A.
Changes in the expression of single-copy DNA during development of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum.
J. Mol. Biol. 66, 363 - 377 (1972)

41. GIRARD, M.
Isolation of ribonucleic acids from mammalian cells and animal viruses.
In: Methods in Enzymology, Vol. XII A, eds. COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (GROSSMAN, L. & MOLDAVE, K.)
(Academic Press, New York and London) 581 - 586 (1967)

42. HENDLER, J.F., PADMANABAN, G., PATZER, J., RYAN, R., & RABINOWITZ, M.
Yeast mitochondrial RNA contains a short polyadenylic acid segment.
Nature 258, 357 - 359 (1975)

43. TANAKA, Y. & KAJI, H.
The role of ribosomal protein for the binding of dihydrostreptomycin to ribosomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 313 - 319 (1968)

44. LANCINI, G., PALLANZA, R. & SILVESTRI, L.G.
Relationship between bactericidal effect and inhibition of ribonucleic acid nucleotidyltransferase by rifampicin in Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol. 97, 761 - 768 (1969)

45. YANG, S. & CRIDDLE, R.S.
In vitro biosynthesis of membrane proteins in isolated mitochondria from Saccharomyces carlsbergensis.
Biochemistry -USA- 9, 3063 - 3072 (1970)

46. WINTERSBERGER, E. & WINTERSBERGER, U.
Rifamycin insensitivity of RNA-synthesis in yeast.
FEBS LETTERS 6, 58 - 60 (1970)

47. WEHRLI, W., NÜESCH, J., KNÜSEL, F. & STAEHELIN, M.
Action of rifamycins on RNA polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 157, 215 - 217 (1968)

48. FIRTEL, R.A. & LODISH, H.F.
A small nuclear precursor of messenger RNA in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum.
J. Mol. Biol. 79, 295 - 314 (1973)

49. ADESNIK, M., SALDITT, M., THOMAS, W. & DARNELL, J.E.
Evidence that all messenger RNA molecules (except histone messenger RNA) contain poly(A) sequences and that the poly(A) has a nuclear function.
J. Mol. Biol. 71, 21 - 30 (1972)

50. LINDBERG, U. & PERSSON, T.
Isolation of mRNA from KB-cells by affinity chromatography on polyuridylic acid covalently linked to Sepharose.
Eur. J. Biochem. 31, 246 - 254 (1972)

51. FIRTEL, R.A., JACOBSON, A. & LODISH, H.F.
Isolation and hybridization kinetics of messenger RNA from Dictyostelium discoideum.
Nature New Biol. 239, 225 - 228 (1972)

52. BONNER, J.T. & FRASCELLA, E.B.
Mitotic activity in relation to differentiation in the slime mold Dictyostelium discoideum.
J. Exp. Zool. 121, 561 - 571 (1952)

53. KATZ, E.R. & BOURGUIGNON, L.Y.W.
The cell cycle and its relationship to aggregation in the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum.
Develop. Biol. 36, 82 - 87 (1974)

54. WILHELMS, O.H., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O. & GERISCH, G.
Glycosphingolipids and Glycoproteins in the wild-type and in a non-aggregating mutant of Dictyostelium discoideum.
Eur. J. Biochem. 48, 89 - 101 (1974)

55. SIMPSON, D.L., ROSEN, S.D. & BARONDES, S.H.
Discoidin, a developmentally regulated carbohydrate-binding protein from Dictyostelium discoideum. Purification and characterization.
Biochemistry -USA- 13, 3487 - 3493 (1974)

56. SUSSMAN, M. & BOSCHWITZ, C.
Adhesiv properties of cell ghosts derived from Dictyostelium discoideum.
Develop. Biol. 44, 362 - 368 (1975)

57. ASHWORTH, J.M. & WATTS, D.J.
Metabolism of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum grown in axenic culture.
Biochem. J. 119, 175 - 182 (1970)

58. COCUCCI, S.M. & SUSSMAN, M.
RNA in cytoplasmic and nuclear fractions of cellular slime mold amebas.
J. Cell Biol. 45, 399 - 407 (1970)

LEBENSLAUF

29.3.1945	geboren in Kowanz/Pommern als Sohn des Landwirts Arnold Baller und seiner Ehefrau Erna, geb. Dettmann
1952 - 1956	Volksschule in Taarstedt/Schleswig
1956 - 1961	Mittelschule in Schleswig
1961 - 1965	Domschule in Schleswig, Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium für Jungen
16.2.1965	Abitur
1965 - 1967	Apothekerpraktikum in der Friedrichsberger Apotheke, Schleswig
14.3.1967	Pharmazeutische Vorprüfung
WS 67 - SS 70	Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/Br.
28.9.1970	Pharmazeutische Prüfung (Staatsexamen)
Nov. 70 - April 71	Kandidatenzeit in der Hubertus-Apotheke Lünen
4.10.1971	Approbation als Apotheker
WS 1971	Immatrikulation für das Fach Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
1971 - 1975	Dissertation unter Prof. Dr. A.W. Holldorf am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum

Allen, die zur Durchführung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, möchte ich meinen Dank aussprechen! Für die Hilfe beim Anfertigen der Zeichnungen danke ich Frau S. Wüthrich. Herrn S. Lux danke ich für seine immer spontane Hilfe in technischen Dingen. Für die Assistenz bei einigen Versuchen danke ich Fräulein U. Behrens.

Herrn Prof. Dr. W. Duntze, Frau Dr. B. Friebe, Herrn Dr. R. Betz und Herrn Dr. F. Wirtz-Peitz danke ich für viele Anregungen und kritische Diskussionen im Laufe der Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. A.W. Holldorf, dem Initiator meiner Arbeit, der mit seinem stetigen Interesse und seiner wertvollen und anregenden Kritik meine Arbeit begleitete und förderte. Ich danke Herrn Prof. Dr. Holldorf auch für die Anstellung und die finanzielle Unterstützung am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum.